

**Studien zur Funktion der
BAP60-Untereinheit des Brahma-Komplexes von
*Drosophila melanogaster***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von André Möller
aus Hamburg

1. Referent: Prof. Dr. H.-H. Arnold

2. Referent: Prof. Dr. H. Jäckle

eingereicht am: 29.04.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.08.2004

Druckjahr 2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Möller, A. & Jäckle, H.: BAP60 Is an Essential Component of the Brahma Chromatin Remodeling Complex. (Poster) 44th Annual Drosophila Research Conference, Chicago (2003).

Möller, A. & Jäckle, H.: BAP60 Is an Essential Component of the Brahma Chromatin Remodeling Complex and Shows DNA Binding Activity. (Poster) 18th European Drosophila Research Conference, Göttingen (2003).

'As flies to wanton boys are we to the gods;
They kill us for their sport.'

William Shakespeare,
King Lear IV.i (First Folio, 1623)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Struktur des Chromatins	3
1.2 Veränderung der Chromatin-Struktur durch enzymatische Aktivitäten	5
1.3 Komplexe des SWI/SNF-Typs	6
1.4 Der Brahma-Komplex von <i>Drosophila melanogaster</i>	10
1.5 Geschlechtsfestlegung bei <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2. Ergebnisse	17
2.1 Expressionsmuster der <i>Bap60</i> -mRNA	18
2.2 Erzeugung einer <i>Bap60</i> -Nullmutante mittels impräziser P-Element-Exzision	19
2.2.1 Lage der P-Element-Insertion <i>G1131</i>	20
2.2.2 P-Element-Exzision	21
2.2.3 Revertierung der Letalität durch transgene Expression von <i>Bap60</i>	23
2.3 Phänotypische Charakterisierung von <i>Bap60^l</i>	25
2.3.1 Bestimmung des Letalitätszeitpunktes von <i>Bap60^l</i>	25
2.3.2 Analyse von Kutikula, Nervensystem und Muskulatur	27
2.3.3 Auswirkung von <i>Bap60^l</i> in der weiblichen Keimbahn	28
2.4 Genetische Studien zur Funktion von <i>Bap60</i>	30
2.4.1 Genetische Interaktion mit anderen Untereinheiten des Brahma-Komplexes	30
2.4.2 Untersuchung der Funktion von <i>Bap60</i> in der Aktivierung von <i>Antp</i>	31
2.4.3 Untersuchung der Rolle von <i>Bap60</i> in der Positionseffekt-Variegation	32
2.5 Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von BAP60	34
2.5.1 Feststellung der DNA-Bindung	34
2.5.2 Identifizierung einer DNA-Bindungsdomäne in BAP60	36
2.5.3 Überprüfung sequenzabhängiger DNA-Bindung durch die BAP60-DBD	39
2.5.4 Bindung der BAP60-DBD an polytären Chromosomen <i>in vivo</i>	44
2.5.5 Auswirkung mutierter Formen der BAP60-DBD auf die Funktion <i>in vivo</i>	45

2.6 Untersuchungen zur Beteiligung von BAP60 an der Geschlechtsfestlegung	47
2.6.1 Prüfung einer genetischen Interaktion zwischen <i>Bap60</i> und den Numerator-Elementen <i>sisA</i> und <i>sc</i>	48
2.6.2 Bindung von BAP60 an SISA und SC <i>in vitro</i>	51
3. Material und Methoden	53
3.1 Genetik	53
3.1.1 Fliegenstämme	53
3.1.2 Erzeugung transgener Fliegen	53
3.1.3 Induktion von Keimbahnklonen	55
3.2 Embryologie	55
3.2.1 Eiablagen	55
3.2.2 Fixierung von Embryonen	55
3.2.3 <i>In-situ</i> -Hybridisierung an Embryonen	56
3.2.4 Antikörperfärbung an Embryonen	57
3.2.5 Kutikulapräparation	58
3.2.6 Isolierung intakter Speicheldrüsen-Kerne	59
3.2.7 Herstellung von Chromosomen-Quetschpräparaten für die Immunfärbung	59
3.2.8 Immunfärbung an polytären Chromosomen	60
3.3 Molekularbiologische Methoden	61
3.3.1 Präparation genomischer DNA	61
3.3.2 PCR	62
3.3.3 Mutagenese	63
3.3.4 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden	64
3.3.5 Sequenzierungen	64
3.3.6 Plasmide	65
3.4 Proteinbiochemische Methoden	68
3.4.1 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine	68
3.4.2 Reinigung rekombinanter Proteine	69
3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	69
3.4.4 DNA-Coimmunopräzipitation	70
3.4.5 SELEX	71

3.4.6 EMSA	72
3.4.7 Untersuchung von Proteinwechselwirkungen	74
3.5 Bioinformatik	74
4. Diskussion	76
4.1 Die funktionelle Relevanz von BAP60 <i>in vivo</i>	76
4.2 BAP60 als Modulator der Positionseffekt-Variegation	81
4.3 DNA-Bindung durch BAP60 <i>in vitro</i> und seine Assoziation mit Chromatin <i>in vivo</i>	83
4.4 Die Beteiligung von BAP60 an der Aktivierung von <i>Sxl-Pe</i>	86
4.5 Schlussbemerkungen	89
5. Zusammenfassung	91
6. Literatur	92

Abkürzungen

<i>act</i>	Aktin-Promotor
<i>Antp</i> , ANTP	<i>Antennapedia</i>
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAP	Brahma-assoziiertes Protein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
<i>bcd</i> , BCD	<i>bicoid</i>
bp	Basenpaare
<i>brm</i> , BRM	<i>brahma</i>
BSA	Rinderserumalbumin
C-	carboxy-
cDNA	komplementäre DNA
DAB	Diaminobenzidin
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DFS	<i>dominant female sterile</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxygenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat
EMSA	<i>electromobility shift assay</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FLP	Flippase
FRT	<i>flippase recombination target</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HD	Homöodomäne
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton

Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
<i>mor</i> , MOR	<i>moira</i>
N-	amino-
NBT	Nitroblautetrazoliumsalm
OD ₆₀₀	Extinktion bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEV	Positionseffekt-Variegation
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSC	<i>remodels the structure of chromatin</i>
<i>sc</i> , SC	<i>scute</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	<i>selective evolution of ligands by exponential enrichment</i>
<i>sisA</i> , SISA	<i>Sisterless A</i>
<i>snr1</i> , SNR1	<i>Snf5-related 1</i>
SWI/SNF	<i>switching-defective/sucrose non-fermenting</i>
<i>Sxl</i> , SXL	<i>Sex-lethal</i>
<i>Sxl-Pe</i>	früher Promotor von <i>Sxl</i>
<i>Sxl-Pm</i>	später Promotor von <i>Sxl</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
<i>trx</i>	<i>trithorax</i>
UAS	<i>upstream activating sequences</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>y</i>	<i>yellow</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Mit der Aufklärung der Struktur der Desoxyribonukleinsäure durch J. Watson, F. Crick, R. Franklin und M. Wilkins im Jahr 1953 erschloss sich unmittelbar die Grundlage der Informationscodierung in lebenden Systemen (Watson und Crick, 1953; Wilkins *et al.*, 1953; Franklin und Gosling, 1953). Die Formulierung der Sequenzhypothese und des zentralen Dogmas der Molekularbiologie durch F. Crick im Jahr 1957 wies darüber hinaus auf die Prinzipien der Informationsauslesung zur Bildung zellulärer Strukturen hin (Crick, 1958). Kein Organismus exprimiert jedoch zu irgendeinem Zeitpunkt sein volles genomisches Potenzial. Die Regulation der Genaktivität ist zentraler Baustein für das Verständnis von Differenzierungsprozessen während der Individualentwicklung der Organismen und ihrer späteren Anpassungsfähigkeit.

Erst mit der Postulierung *cis*-agierender Operator-Regionen durch F. Jacob und J. Monod (Jacob und Monod, 1961) und dem Nachweis, dass die DNA-Sequenz eines solchen Operators selbst die funktionelle Einheit des Operators darstellt und Ziel sequenzspezifisch bindender Proteine ist (Ptashne, 1967; Gilbert und Muller-Hill, 1967), gelangte der Aspekt der Genregulation in den Bereich der wissenschaftlichen Forschung. Seither sind auch in eukaryotischen Organismen eine Vielzahl unterschiedlichster Transkriptionsfaktoren und genomischer Regulationseinheiten identifiziert worden, die in der spezifischen Regulation der Genaktivität eine entscheidende Rolle spielen (Latchman, 1995). Es zeigte sich jedoch, dass die Vorstellung einer direkten Aktivierung oder Repression der Transkription durch Wechselwirkungen der basalen Transkriptionsmaschinerie mit speziellen Transkriptionsfaktoren ein unvollständiges Bild der Situation *in vivo* darstellt. Die DNA im Zellkern der Eukaryoten liegt in einer hochkompaktierten Form vor, deren niedrigste Organisationsebene durch so genannte Nukleosomen gebildet wird (Olins und Olins, 1974; Kornberg, 1974). Die dadurch erzielte Verpackung der genomischen Information wirkt generell reprimierend auf die Genaktivität und muss in einem ersten Schritt der Genaktivierung überwunden werden. Diesem Zweck dienen spezialisierte Protein-Komplexe (Übersichtsartikel von Vignali *et al.*, 2000), die durch ihre Aktivität Veränderungen an der nukleosomalen Struktur herbeiführen (Chromatin-Remodellierung). Sie können dabei sowohl aktivierend wirken als auch in

der Genrepression eine Rolle spielen. Die Kompaktierung eukaryotischer DNA stellt somit eine weitere Ebene in der Kontrolle der Genexpression dar.

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* hat als Modellorganismus in den vergangenen Jahrzehnten eine wichtige Rolle in der Erforschung von Genregulationsprozessen gespielt. Mit Hilfe diverser embryologischer, genetischer und molekularbiologischer Methoden war es möglich, Einblicke in verschiedenste Differenzierungsprozesse von *Drosophila* zu erhalten. Dabei wurde deutlich, welche zentrale Rolle Transkriptionsfaktoren beim Aufbau des Körperplans und bei der Identitätsgebung einzelner Körperabschnitte spielen (Übersichtsartikel von Niessing *et al.*, 1997). Die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren in diesen Prozessen folgt direkt aus der Notwendigkeit zur differenziellen Auslesung der genomischen Information: die erfolgreiche Umsetzung der strukturellen Information des Genoms setzt die korrekte Anwendung der regulatorischen Information des Genoms voraus. Aufgrund der Erkenntnisse, die bisher über die Kontrolle von Differenzierungsprozessen in diesem Organismus gewonnen werden konnten, eignet sich *Drosophila* hervorragend, um die Funktion einzelner Faktoren zu untersuchen, die allgemein am Prozess der Genregulation beteiligt sind.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung der in allen eukaryotischen Organismen konservierten BAP60-Untereinheit des Chromatinremodellierenden Komplexes Brahma von *Drosophila melanogaster*. Mit Hilfe der vielseitigen, für die Forschung an *Drosophila* zur Verfügung stehenden Methodologie sollte die Relevanz dieses Proteins für die Genregulation untersucht werden.

In den folgenden Abschnitten werden die Organisation eukaryotischer DNA und die Prinzipien der Chromatin-Remodellierung kurz rekapituliert. Nachfolgend wird näher auf die Arbeitsweise Chromatin-remodellierender Komplexe des SWI/SNF-Typs im Allgemeinen und auf den SWI/SNF-artigen Brahma-Komplex im Speziellen eingegangen. Den Abschluss bildet eine Darstellung der genetischen Prozesse, die bei *Drosophila melanogaster* zur Festlegung des Geschlechts führen. Gemäß der vorliegenden Studie ist die BAP60-Untereinheit des Brahma-Komplexes an diesem Vorgang direkt beteiligt.

1.1 Struktur des Chromatins

Die DNA eukaryotischer Zellen ist im hohen Maße mit Proteinen komplexiert. Daraus ergeben sich Strukturen, die allgemein als Chromatin bezeichnet werden (Miescher, 1871; Fleming, 1882). Die Struktur des Chromatins ist jedoch nicht als statisch oder gar uniform zu betrachten. Die Anforderungen von Transkription, Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination verlangen nach dynamischen Veränderungen der Chromatin-Struktur, wodurch diese sich in einem ständigen Fluss befindet. Tatsächlich ist bis zum heutigen Tag jedoch nur die unterste Ebene der Chromatinorganisation im Detail bekannt. In diesem ersten Verpackungsschritt ist die DNA um ein Oktamer aus Histon-Proteinen gewickelt (H2A, H2B, H3 und H4; Olins und Olins, 1974; Kornberg, 1974); die dadurch gebildete Struktur wird als Nukleosom bezeichnet (Oudet *et al.*, 1975). Der DNA-Doppelstrang zeigt dabei 1,67 Windungen um das zentral liegende Histon-Oktamer, wodurch insgesamt 146 Basenpaare im engen Kontakt mit den Histonen stehen. Auf diese Weise entsteht eine Struktur mit ca. 11 nm Durchmesser und 5 nm Höhe (Richmond *et al.*, 1984; Luger *et al.*, 1997). Neben derjenigen DNA, die im direkten Kontakt zu den Histonen steht, wird dem Nukleosom auch diejenige DNA zugeordnet, welche den Bereich zwischen zwei Histon-Oktameren überbrückt. Die Länge dieser so genannten Linker-DNA ist variabel und liegt je nach Organismus und Zelltyp bei durchschnittlich 8-114 Basenpaaren (van Holde, 1989). Die Aufwindung der DNA in nukleosomalen Strukturen hat direkten Einfluss auf ihre Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und spielt somit eine wichtige Rolle in der Genregulation (Pina *et al.*, 1990).

Die Details des Chromatin-Aufbaus sind jedoch bereits bei der nächsthöheren Organisationsebene weitestgehend unklar. Ketten von Nukleosomen können *in vitro* bei bestimmten Ionenstärken Fasern mit einem Durchmesser von 30 nm bilden (Finch und Klug, 1976; Renz *et al.*, 1977). Chromatin-Fasern gleichen Durchmessers lassen sich auch *in situ* in elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen (Everid *et al.*, 1970). Die Art und Weise, in der sich Nukleosomen zu solchen Fasern ordnen, ist jedoch noch Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Sowohl eine helikale (Finch und Klug, 1976) wie auch eine Zickzack-Anordnung (Bednar *et al.*, 1998) der Nukleosomen wurde postuliert (Abb. 1-1). Nach derzeitigem Stand scheint letztere

jedoch eher im Einklang mit den experimentellen Ergebnissen zu stehen (Übersichtsartikel von Woodcock und Dimitrov, 2001).

Bei der Frage nach der nächsten Stufe der Chromatin-Organisation hat sich die Modellvorstellung einer schleifenförmigen Anordnung der 30-nm-Fasern durchgesetzt, in der die einzelnen Schleifen über Bindung an einem chromosomalen Gerüst fixiert sind (Paulson und Laemmli, 1977). Die Größe dieser Schleifen wird auf 40 bis 90 kb geschätzt (Jackson *et al.*, 1990). Die Anheftung der Schleifenendpunkte wird durch spezialisierte DNA-Elemente vermittelt, welche in der Lage sind, mit dem Kerngerüst oder einer spezialisierten Kernmatrix zu wechselwirken (*scaffold associated regions*, SARs; Übersichtsartikel von Laemmli *et al.*, 1992). Die Ausbildung von Schleifenstrukturen wird auch für die Abgrenzung von Domänen aktiven oder reprimierten Chromatins verantwortlich gemacht (Byrd und Corces, 2003; Blanton *et al.*, 2003). Wie bereits auf der Ebene der Nukleosomen scheint es somit auch hier einen direkten Zusammenhang zwischen der strukturellen Organisation des Chromatins und der Regulation der Genaktivität zu geben.

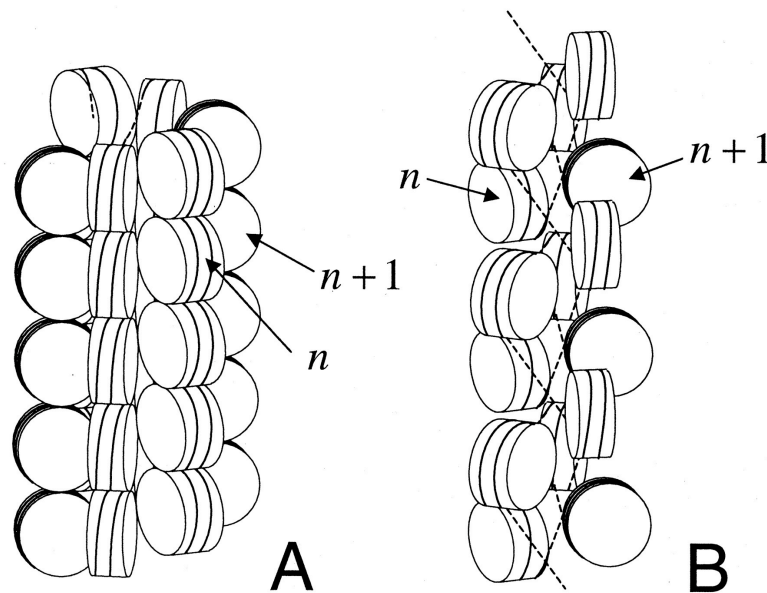


Abb. 1-1 Darstellung der zwei vorherrschenden Modelle zum Aufbau der 30-nm-Faser. (A) Im Solenoid-Modell bildet die Nukleosomenkette eine helikale Struktur aus, bei der die Linker-DNA zwischen den einzelnen Nukleosomen aufgewickelt ist. (B) Das Zickzack-Modell geht von gerader Linker-DNA aus; diese verbindet Nukleosomen, welche sich innerhalb der Faser gegenüberliegen. In der linearen DNA-Sequenz aufeinanderfolgende Nukleosomen sind mit n und $n+1$ bezeichnet (Aus Schiessel *et al.*, 2001).

1.1 Veränderung der Chromatin-Struktur durch enzymatische Aktivitäten (Chromatin-Remodellierung)

Der Begriff der Chromatin-Remodellierung bezieht sich allgemein auf all solche Vorgänge, welche die Sensitivität einer Chromatin-Region für den Verdau durch Nukleasen verändern (Aalfs und Kingston, 2000). Der erste Hinweis auf die Bedeutung der Chromatin-Konformation für die Genregulation ergab sich durch die Beobachtung, dass aktiv transkribierte Chromatin-Regionen eine erhöhte Sensitivität für Nukleasen aufweisen (Weintraub und Groudine, 1976). Außer dieser allgemeinen Sensitivität aktiven Chromatins lassen sich innerhalb verschiedenster Gen-Loci kurze Sequenz-Abschnitte von maximal einigen hundert Basenpaaren finden, die eine außergewöhnlich hohe Sensitivität für Nukleasen zeigen (Elgin, 1988). Diese so genannten hypersensitiven Stellen korrelieren mit funktionellen DNA-Elementen wie z.B. Promotoren, Enhancern und Locus-Kontroll-Regionen (siehe z.B. Zhang und Gralla, 1990) und sind im Allgemeinen frei von Nukleosomen (Almer und Horz, 1986).

Chromatin-remodellierende Aktivitäten lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bewirkt u.a. durch Acetylierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen kovalente Modifikationen der N-terminalen Histon-Schwänze (Übersichtsartikel von Jenuwein und Allis, 2001). Neben den direkten Auswirkungen, welche diese Modifikationen über Ladungsveränderungen der Histone auf die Kondensationsfähigkeit der Nukleosomen haben können, wurde auch die Existenz eines „Histon-Codes“ postuliert (Strahl und Allis, 2000). Gemäß dieser Hypothese werden Histon-Modifikationen von spezialisierten Proteinen erkannt, die dann durch ihre eigene Aktivität wiederum den Kondensations- und Transkriptionszustand eines Gen-Locus beeinflussen können.

Die zweite Gruppe Chromatin-remodellierender Aktivitäten umfasst solche Faktoren, die in ATP-abhängiger Weise die nukleosomale Konformation direkt verändern. Es handelt sich hierbei ausnahmslos um aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzte Komplexe. Jeder der Komplexe enthält eine ATP-hydrolysierende Untereinheit, die zur Swi2/Snf2-Superfamilie der ATPasen gehört (Eisen *et al.*, 1995). Zu den beobachteten Auswirkungen dieser Komplexe auf ihre nukleosomalen Substrate gehören eine erhöhte Zugänglichkeit nukleosomaler DNA, eine

Verschiebung von Histon-Oktameren hin zu benachbarten DNA-Abschnitten und eine Übertragung von Oktameren auf DNA-Segmente in *trans* (Vignalli et al., 2000). Je nach der Zugehörigkeit ihrer ATP-hydrolysierenden Untereinheit werden die Komplexe einer von vier Klassen zugeordnet: SWI/SNF, ISWI, CHD, oder INO80 (Tsukiyama, 2002). Die verschiedenen Komplexarten unterscheiden sich in ihren *In-vitro*-Aktivitäten ebenso wie in ihrer Bedeutung *in vivo* (Vignalli et al., 2000; Tsukiyama, 2002).

1.2 Komplexe des SWI/SNF-Typs

Der SWI/SNF-Komplex der Hefe war der erste ATP-abhängige Chromatin-remodellierende Komplex, der aufgereinigt wurde (Cairns *et al.*, 1994; Cote *et al.*, 1994). Viele seiner Untereinheiten waren in der Hefe bereits zuvor in genetischen Versuchen identifiziert worden, die sich mit dem Wechsel des Paarungstyps und der Verwertung von Sucrose als Kohlenstoffquelle beschäftigten (Stern *et al.*, 1984; Neigeborn und Carlson, 1984). Mutierte Gene, die zu Defekten in diesen Prozessen führen, sind an der Aktivierung der Gene der HO-(*homothallic switching*-)Endonuklease (HO-Gen) und des Sucrose-hydrolysierenden Enzyms (SUC2-Gen) beteiligt und tragen daher die Namen SWI (*switching-defective*) bzw. SNF (*sucrose non-fermenting*). Es zeigte sich, dass es sich dabei in vielen Fällen um dieselben Gene handelte und dass ihre Wirkungsweise bei der Aktivierung des SUC2-Gens in der Bildung einer offenen Chromatin-Struktur im Promotor-Bereich liegt (Hirschhorn et al., 1992).

In der Folge sind Komplexe aus verschiedenen Organismen isoliert worden, deren Untereinheiten Homologien zu denen des SWI/SNF-Komplexes zeigen. Allen gemein ist eine DNA-abhängige ATPase-Untereinheit, die dem gleichen Typus angehört wie die SWI2/SNF2-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes. Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht aller bis zum heutigen Tag isolierten Komplexe des SWI/SNF-Typs. In Tabelle 1-2 sind darüber hinaus die konservierten Untereinheiten eines Teils dieser Komplexe dargestellt. Neben diesen Untereinheiten besitzt jeder Komplex zusätzlich eine unterschiedliche Anzahl nicht-konservierter Untereinheiten. Das experimentell ermittelte Molekulargewicht des SWI/SNF-Komplexes der Hefe liegt bei 2 MDa. Von den in Tabelle 1-2 aufgeführten Untereinheiten liegt nur Swp3 in einer Stöchiometrie

von zwei Kopien pro Komplex vor, alle anderen Untereinheiten sind in jedem Komplex nur einmal enthalten (Smith *et al.*, 2003). Um eine Remodellierungsaktivität zu erreichen, welche der des nativen Komplexes sehr nahe kommt, waren in einem Rekonstitutionsversuch *in vitro* nur die humanen Untereinheiten BRM (bzw. BRG1), INI1, BAF155 und BAF170 nötig (Phelan *et al.*, 1999). Diese Untereinheiten scheinen damit den funktionellen Kern des Komplexes zu definieren.

Tabelle 1-1 Übersicht der bis heute isolierten Komplexe des SWI/SNF-Typs.

Organismus	Bezeichnung	Referenz
Hefe	SWI/SNF	Cairns <i>et al.</i> , 1994
	RSC	Cairns <i>et al.</i> , 1996a
	RSCa	Cairns <i>et al.</i> , 1996a
<i>Drosophila</i>	Brahma	Papoulas <i>et al.</i> , 1998
Mensch	hSWI/SNF-A (BAF)	Xue <i>et al.</i> , 2000
	hSWI/SNF-B (PBAF)	Xue <i>et al.</i> , 2000
	hBrm	Sif <i>et al.</i> , 2001
	hBrg1 (I)	Sif <i>et al.</i> , 2001
	hBrg1 (II)	Sif <i>et al.</i> , 2001
	EBAFa	Nie <i>et al.</i> , 2003
	EBAFb	Nie <i>et al.</i> , 2003

Der Mechanismus der SWI/SNF-vermittelten Remodellierung liegt neueren Untersuchungen zufolge in einer ATP-abhängigen Translokase-Aktivität der katalytischen Untereinheit begründet. Der Komplex bleibt dabei am Ein- bzw. Ausgangspunkt der DNA des Nukleosoms fixiert (Lorch *et al.*, 1998; Lorch *et al.*, 2001) und zieht die DNA an sich vorbei (Saha *et al.*, 2002). Dadurch kommt es zu einer teilweisen Loslösung nukleosomaler DNA und zur Ausbildung einer „DNA-Welle“, die sich um das Nukleosom herum bewegt. Dieser Prozess kann schließlich zu einer veränderten Positionierung des Nukleosoms führen. Die freiliegende DNA innerhalb einer „DNA-Welle“ könnte aber auch direkt als Zugangspunkt für Transkriptionsfaktoren dienen und damit die Aktivierung von Genen ermöglichen.

Tabelle 1-2 Zusammensetzung einiger SWI/SNF-artiger Komplexe verschiedener Organismen.

Hefe		<i>Drosophila</i>	Mensch		
SWI/SNF	RSC	BRM	BAF	PBAF	HBrm
Swi1/Adr6		ELD/OSA	BAF250, hELD		BAF250
Swi2/Snf2	Sth1/Nps1	BRM	Brm, Brg1	Brg1	Brm
Swi3	Rsc8/Swh3	BAP155/ MOIRA	BAF170, BAF155	BAF170, BAF155	BAF170, BAF155
Snf5	Sfh1	SNR1	Snf5/Ini1	Snf5/Ini1	Snf5/Ini1
Swp73/ Snf12	Rsc6	BAP60	BAF60a	BAF60a	BAF60a
Arp9/Swp59	Arp9/Rsc12	BAP55 (?)	BAF53 (?)	BAF53 (?)	BAF53 (?)
Arp7/Swp61	Arp7/Rsc11	BAP47/ ACT1	β-Aktin	β-Aktin	
	Rsc1, Rsc2			Polybromo/ BAF180	
		BAP111		BAF57	BAF57

Nach Martens und Winston, 2003; verändert. Nicht aufgelistet sind solche Untereinheiten, die auf einen einzigen Komplex beschränkt sind.

SWI/SNF-artige Komplexe spielen allerdings nicht nur in der Aktivierung von Genen eine Rolle, sondern können auch an der Repression beteiligt sein. So zeigten Chromatin-Immunoprecipitationsversuche die Anwesenheit SWI/SNF-artiger Komplexe an reprimierten Promotoren (Martens und Winston, 2002; Battaglioli *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002). Tatsächlich sind die heutigen Vorstellungen von der Funktionsweise dieser Komplexe mit beiden Prozessen kompatibel: Verschiebung und Neupositionierung von Nukleosomen können sowohl zu einer Freilegung von Aktivatorsequenzen führen als auch zu deren Verdeckung. Ferner ist denkbar, dass durch die Remodellierungsaktivität Zielstrukturen von Repressorproteinen freigelegt werden können.

Die Forschung an einer ganzen Reihe von Genen hat zu detaillierten Vorstellungen über die einzelnen Schritte geführt, die von der verpackten Form eines Gens bis hin zu seiner Aktivierung führen (Übersichtsartikel von Fry und Peterson, 2002, und von

Cosma, 2002). Dabei wurde deutlich, dass es keinen allgemein gültigen sequenziellen Ablauf der daran beteiligten Prozesse gibt: der Bindung von Transkriptionsfaktoren, der kovalenten Modifizierung von Histonen, der ATP-abhängigen Remodellierung von Nukleosomen und der Zusammensetzung des Präinitiationskomplexes. Stattdessen kann z.B. eine Rekrutierung SWI/SNF-artiger Komplexe abhängig vom betrachteten Gen zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Aktivierungsprozesses stattfinden. Im Falle des *HO*-Gens der Hefe ist die vorherige Bindung des Transkriptionsfaktors Swi5p Voraussetzung für die Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes, welcher wiederum die Rekrutierung des Histon-acetylierenden Komplexes SAGA ermöglicht. Die remodellierende Aktivität beider Komplexe führt schließlich zur Bindung eines zweiten Transkriptionsfaktors, SBF, der für den weiteren Aktivierungsverlauf verantwortlich ist (Cosma *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 1999). Beim *Interferon- β* -Gen des Menschen hingegen findet die ATP-abhängige Remodellierung erst nach Rekrutierung eines Histon-acetylierenden Komplexes statt und stellt den letzten Schritt vor Bindung des TATA-bindenden Proteins und des folgenden Aufbaus des Präinitiationskomplexes dar (Agalioti *et al.*, 2000). Eine weitere Variante wurde am α_1 -*Antitrypsin*-Promotor festgestellt. Hier ist bereits der komplette Präinitiationskomplex assembliert und sogar die carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II bereits phosphoryliert, bevor der humane SWI/SNF-Komplex hBrm rekrutiert wird und durch seine Aktivität die Transkription ermöglicht (Soutoglou und Talianidis, 2002). Eine Auflockerung der Chromatin-Struktur durch Chromatin-remodellierende Komplexe steht somit nicht zwingend am Beginn einer Aktivierungskaskade. Die gezielte Rekrutierung SWI/SNF-artiger Komplexe durch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren spielt jedoch bei vielen untersuchten Aktivierungsprozessen eine wichtige Rolle, unabhängig vom relativen Zeitpunkt der Rekrutierung.

Verschiedene Untereinheiten SWI/SNF-artiger Komplexe sind an der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren beteiligt. So sind die SWI/SNF-Untereinheiten Snf5, Swi1 und Swi2/Snf2 der Hefe in der Lage, mit den Transkriptionsfaktoren Gcn4 und Hap4 zu wechselwirken (Neely *et al.*, 2002). Darüber hinaus interagiert die MOR-Untereinheit des Brahma-Komplexes von *Drosophila* mit dem Transkriptionsfaktor Zeste (Kal *et al.*, 2000). Ferner bindet die humane Untereinheit BAF57 den Östrogen-Rezeptor (Belandia *et al.*, 2002) und Mitglieder der humanen BAF60-Familie das

cJun/cFos-Heterodimer (Ito *et al.*, 2001) und diverse Kernrezeptoren (Hsiao *et al.*, 2003; Debril *et al.*, 2004; Koszewski *et al.*, 2003). Im Kontext des Rekrutierungsprozesses mögen auch diverse DNA-Bindungsmotive aktiv sein, die in verschiedenen Untereinheiten SWI/SNF-artiger Komplexe zu finden sind (Martens und Winston, 2003). Keine dieser Untereinheiten findet sich jedoch in allen bekannten Komplexen. Einen Sonderfall stellt die humane Untereinheit hBrm dar; diese ist als katalytische Untereinheit selbst zwar konserviert, besitzt jedoch ein nicht konserviertes DNA-Bindungsmotiv (Bourachot *et al.*, 1999). Neben einer Rolle in der Rekrutierung ist für diese DNA-Bindungsmotive auch eine modulierende Funktion während des Remodellierungsprozesses denkbar. So zeigte sich, dass die HMG-Domäne der humanen Untereinheit BAF57 für die Komplex-vermittelte Transkriptionskontrolle des CD4-Gens notwendig ist, ohne aber an der Rekrutierung des Komplexes beteiligt zu sein (Chi *et al.*, 2002).

1.3 Der Brahma-Komplex von *Drosophila melanogaster*

Das Expressionsmuster homöotischer Gene wird in der frühen *Drosophila*-Entwicklung durch die nur vorübergehend exprimierten Segmentierungsgene festgelegt. Nach ihrem Verschwinden halten zwei unterschiedliche Klassen von Genprodukten den reprimierten bzw. aktiven Status homöotischer Genexpression aufrecht: die reprimierend wirkende Polycomb-Gruppe und die aktivierend wirkende Trithorax-Gruppe (siehe die Übersichtsartikel von Mahmoudi und Verrijzer, 2001, und von Simon und Tamkun, 2002). Das *Drosophila*-Genom enthält ein einziges Gen, das dem *Swi2/Snf2*-Gen der Hefe nahe verwandt ist. Dieses Gen, *brahma* (*brm*), gehört der Trithorax-Gruppe an und wurde ursprünglich aufgrund der Eigenschaft seiner Mutanten identifiziert, *Polycomb*-Mutationen zu supprimieren (Kennison und Tamkun, 1988).

Die Aufreinigung BRM-assoziierter Proteine resultierte in der Isolierung eines Komplexes, der in vielen seiner Untereinheiten Homologien zu den SWI/SNF-, RSC- und hBRM-Komplexen zeigte (Papoulas *et al.*, 1998). Zwei der Untereinheiten, *moira* (*mor*) und *osa*, waren zuvor zusammen mit *brm* als Mitglieder der Trithorax-Gruppe identifiziert worden. Außer diesen sind zwei weitere Untereinheiten, *snr1* und *Bap60*, in den Hefe- und Säuger-Komplexen hochkonserviert. Da *osa*-Homologe nicht in

allen Komplexen enthalten sind und OSA auch nicht in allen Aufreinigungen des Brahma-Komplexes auftritt, bilden jedoch nur die Proteine BRM, MOR, SNR1 und BAP60 den konservierten Kern des Brahma-Komplexes. Der Komplex ist im frühen Embryo mit ungefähr einer Kopie pro 20 Nukleosomen in großen Mengen vorhanden (Elfring *et al.*, 1998) und ähnelt darin dem RSC-Komplex der Hefe eher als dem SWI/SNF-Komplex. Letzterer ist in der Hefe mit weniger als 200 Kopien pro Zelle vertreten (Cairns *et al.*, 1996a). Auch ist der SWI/SNF-Komplex nicht essenziell für das Überleben des Organismus, während dies sowohl auf den RSC-Komplex wie auch auf den Brahma-Komplex zutrifft.

Die Beteiligung von Proteinen der Polycomb- und Trithorax-Gruppen an der korrekten Expression homöotischer Gene machte zwar die Identifikation ihrer Gene vergleichsweise einfach. Allerdings liegt ihre Bedeutung bei weitem nicht nur in der Kontrolle homöotischer Gene. Dies wird allein schon dadurch deutlich, dass homozygote *brm*-Mutanten als ungeschlüpfte Larven sterben, ohne dass sie spezifische Defekte im Segmentierungsmuster aufweisen (Tamkun *et al.*, 1992). Beim Ausfall maternaler *brm*-Funktion kommt es zu einer Blockierung der Oogenese (Brizuela *et al.*, 1994). Die Analyse somatischer *brm*-Klone wies darüber hinaus auf eine Bedeutung von *brm* für die generelle Lebensfähigkeit der Zellen hin (Elfring *et al.*, 1998). Tatsächlich ist BRM in polytären Chromosomen mit fast dem gesamten transkriptionell aktiven Chromatin assoziiert. Auch zeigte sich, dass eine Beeinträchtigung der BRM-Funktion zu einem starken Verlust Chromatin-assoziiierter RNA-Polymerase II führt (Armstrong *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Brahma-Komplex eine globale Rolle in der Genregulation spielt. Ähnlich wie bei den Komplexen der Hefe gibt es jedoch auch beim Brahma-Komplex Anzeichen dafür, dass der Komplex nicht nur aktivierend wirkt. So sind OSA-enhaltende Brahma-Komplexe sowohl im Embryo als auch in den Flügel-Imaginalscheiben für die Repression von Zielgenen des Wingless-Signalweges notwendig (Collins und Treisman, 2000). Außerdem ist BRM an polytären Chromosomen im geringen Maße auch mit solchen Bereichen verhaftet, die transkriptionell nicht aktiv sind (Armstrong *et al.*, 2002).

Neben seiner Rolle in der Genregulation besitzt der Brahma-Komplex auch eine Bedeutung in der Kontrolle des Zellzyklus. Eine genetische Studie identifizierte *brm*, *mor* und *snr1* als Interaktoren des *Drosophila*-Homologs von Cyclin E (Brumby *et*

al., 2002), das als Komplex mit der Kinase Cdk2 eine wichtige Rolle im Übergang von der G1-Phase in die S-Phase spielt. Mutationen in diesen Untereinheiten des Brahma-Komplexes unterdrückten einen hypomorphen Cyclin E-Phänotyp, indem sie den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus erleichterten. Dies deutet darauf hin, dass der Brahma-Komplex im Normalfall als negativer Regulator des S-Phasen-Übergangs wirkt. Weder das Expressionsniveau von Cyclin E selbst noch die Expression verschiedener, von Cyclin E indirekt kontrollierter S-Phasen-Gene sind jedoch in *brm*-Mutanten verändert, so dass der Mechanismus, über den der Brahma-Komplex den Übergang in die S-Phase beeinflusst, unklar geblieben ist. Eine Beteiligung SWI/SNF-artiger Komplexe an der Kontrolle des Zellzyklus ist jedoch auch von anderen Organismen bekannt. Dabei spielt unter anderem eine Wechselwirkung mit dem S-Phasen-Inhibitor Rb eine Rolle (Zhang *et al.*, 2000). Ferner konnte eine Anwesenheit von SWI/SNF-Untereinheiten in Komplexen mit Cyclin E nachgewiesen werden (Shanahan *et al.*, 1999).

Die für die Forschung an *Drosophila* zur Verfügung stehenden Methoden haben dazu geführt, dass die *In-vivo*-Relevanz vieler Untereinheiten des Brahma-Komplexes gut untersucht ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen auf den essenziellen Charakter vieler dieser Untereinheiten für den Komplex selbst und für die Entwicklung von *Drosophila* hin. So sterben homozygote *osa*-Mutanten spät in der Embryogenese; sie weisen jedoch keine diagnostizierbaren Segmentierungsdefekte auf (Vázquez *et al.*, 1999). Bei gleichzeitigem maternalen und zygotischen Ausfall des Gens werden zwar Eier gelegt, allerdings sterben die Embryonen, bevor sie das Stadium der Kutikula-Bildung erreichen. Des Weiteren spielt OSA eine Rolle in der Brahma-Komplex-vermittelten Reprimierung von Zielgenen des Wingless-Signalweges (Collins und Treisman, 2000). Im Falle der MOR-Untereinheit führen homozygote Mutationen im Embryo zu Defekten in den Kopfstrukturen und den Mundhaken der embryonalen Kutikula, maternale Homozygotie führt zu fehlgebildeten Eiern (Brizuela und Kennison, 1997). MOR ist an der korrekten Expression verschiedener homöotischer Gene in den Imaginalscheiben beteiligt. Bei der SNR1-Untereinheit bewirken homozygote Mutationen ein Absterben der Larven vor dem dritten Larvenstadium, aus Keimbahnklonen gehen keine Eier hervor (Dingwall *et al.*, 1995). Eine temperatursensitive Mutante von *snr1* bewirkt Defekte in verschiedenen Körperstrukturen (Marenda *et al.*, 2003). Die Analyse somatischer Klone einer

weiteren Mutante von *snr1* weist auf eine Bedeutung von SNR1 für die Lebensfähigkeit der Zellen hin (Zrally *et al.*, 2003). Mutationen von *snr1* wirken ferner als Suppressoren der Positionseffekt-Variegation. Dies deutet auf eine Rolle von SNR1 in der Ausbildung heterochromatischer Strukturen hin. Die Bedeutung der BAP111-Untereinheit für die Funktion des Komplexes wurde mit Hilfe einer chromosomalen Defizienz bestätigt, die das *Bap111*-Gen einschloss. Diese Defizienz zeigte genetische Wechselwirkungen mit einem dominant-negativen *brm*-Allel, welche durch Einkreuzen eines *Bap111*-Transgens unterdrückt werden konnten (Papoulas *et al.* 2001).

Zusammenfassend betrachtet ist den Mutanten konservierter Untereinheiten des Brahma-Komplexes ein embryonales oder larvales Absterben gemein, das nicht auf diagnostizierbare Entwicklungsdefekte zurückgeführt werden kann. Des Weiteren kommt es bei maternalem Ausfall dieser Untereinheiten zu Defekten innerhalb der Oogenese. Die sowohl für *brm* als auch für *snr1* gezeigte Bedeutung für das Überleben somatischer Zellen könnte den Grund für das beobachtete Absterben bei zygotischem Ausfall dieser Gene darstellen.

Die BAP60-Untereinheit ist die einzige der konservierten Untereinheiten des Brahma-Komplexes, die bisher aufgrund des Fehlens einer geeigneten Mutante funktionell uncharakterisiert geblieben ist. Sie ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 Geschlechtsfestlegung bei *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster besitzt wie die Säugetiere zwei Heterosomen, die an der Geschlechtsausprägung beteiligt sind, ein X-Chromosom und ein Y-Chromosom. Anders als bei Säugetieren spielt das Y-Chromosom bei *Drosophila* jedoch keine Rolle in der Geschlechtsfestlegung. Seine Relevanz für die Geschlechtsausprägung liegt nur darin, dass es einige für die Spermienproduktion erforderlichen Gene trägt. Bei *Drosophila* ist es nicht der heterosomale Genotyp an sich, der über das Geschlecht der Fliege entscheidet. Vielmehr ist das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen entscheidend (Bridges, 1925). Weibchen besitzen den Genotyp XX, das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen beträgt 1,0 (2X:2A). Männchen dagegen tragen nur ein X-Chromosom (Genotyp XY), das Verhältnis beträgt hier also

0,5 (1X:2A). Fliegen des Genotyps XO (1X:2A) sind sterile Männchen und nicht, wie bei Säugetieren, Weibchen.

Ein Problem, das alle Organismen betrifft, die über Heterosomen verfügen, ist der unterschiedliche Genbesatz dieser Chromosomen. Dies führt dazu, dass Organismen des Genotyps XY ohne Kompensationsmechanismen nur über die Hälfte der X-chromosomalen Genaktivität verfügen würden wie XX-Individuen. Bei *Drosophila* ist dieses Problem durch Hochregulation der X-chromosomalen Genaktivität in männlichen Fliegen gelöst. Die Initiierung dieser Dosiskompensation ist direkt an die Festlegung des Geschlechts im frühen Embryo gekoppelt.

Entscheidend für die Geschlechtsfestlegung ist der Expressionsstatus des *Sex lethal*-(*Sxl*-)Gens im frühen Embryo. Das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen bestimmt darüber, ob der frühe Promotor (*Pe*) von *Sxl* aktiviert wird oder nicht. In weiblichen Individuen wird der Promotor im Stadium des präzellulären Blastoderms für kurze Zeit angeschaltet, während er in männlichen Individuen ausgeschaltet bleibt. Grundlage für die differenzielle Aktivierung von *Sxl-Pe* sind X-chromosomal codierte, aktivierend wirkende „Numerator-Elemente“ und autosomal codierte, reprimierend wirkende „Denominator-Elemente“. Die Relation von X-Chromosomen zu Autosomen überträgt sich somit direkt in eine Relation von Aktivatoren zu Repressoren. Nur bei Überwiegen der Aktivatoren kommt es zur Aktivierung von *Sxl-Pe* und somit zur Ausprägung des weiblichen Phänotyps. Die bisher identifizierten Numerator-Gene sind *sisterless A* (*sisA*), *scute* (*sc*), *unpaired*, und *runt* (Cline, 1988; Duffy und Gergen, 1991; Erickson und Cline, 1993; Deshpande *et al.*, 1995). Dagegen wurde mit *deadpan* bisher nur ein einziges Denominator-Gen identifiziert (Barbash und Cline, 1995). Außerdem spielen bei der Interpretation des X:A-Verhältnisses auch eine Reihe maternaler Genprodukte eine Rolle. Dazu zählen die aktivierend auf *Sxl-Pe* wirkenden Gene *daughterless* und *hermaphrodite* (Cronmiller *et al.*, 1988; Pultz und Baker, 1995) sowie die reprimierend wirkenden Gene *extramacrochaetae* und *groucho* (Younger-Shepherd *et al.*, 1992; Paroush *et al.*, 1994). Der Mechanismus, über den die Integration positiv und negativ wirkender Faktoren am frühen *Sxl*-Promotor erfolgt, ist noch nicht geklärt. Sowohl das Heterodimer der *daughterless*- und *scute*-Genprodukte wie auch die *runt*- und *deadpan*-Genprodukte verfügen jedoch über spezifische Bindungsstellen innerhalb von *Sxl-Pe* (Hoshijima *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 1999).

Mit Beginn der Zellularisierung des Blastoderms erlischt die Aktivität von *Sxl-Pe* in weiblichen Embryonen und ein zweiter, später Promotor, *Sxl-Pm*, wird in beiden Geschlechtern aktiv. Dieser Promotor bleibt während der gesamten verbleibenden Lebensdauer des Organismus aktiv. Die Funktion des in weiblichen Embryonen gebildeten, frühen SXL-Proteins besteht darin, das *Sxl-Pm*-Primärtranskript einer funktionellen Spleißung zuzuführen. Erfolgt dies nicht, wie in männlichen Embryonen aufgrund des Fehlens frühen SXL-Proteins der Fall, wird das *Sxl-Pm*-Primärtranskript zu einer mRNA gespleißt, die ein zusätzliches Exon enthält, das einen verfrühten Translationsstopp bewirkt (Bell *et al.*, 1988; Bell *et al.*, 1991; Horabin and Schedl, 1993). Die *Sxl-Pe*-mRNA der weiblichen Embryonen weist dieses Exon nicht auf und codiert in jedem Fall für ein funktionelles Protein. Der Wechsel vom frühen *Sxl*-Promotor *Pe* zum späten *Sxl*-Promotor *Pm* führt somit zu einer autoregulatorischen Schleife, welche die differenzielle *Sxl*-Expression auch nach Einsetzen der Dosiskompensation ermöglicht.

Das SXL-Protein wirkt sowohl als Spleißfaktor wie auch als Translationsfaktor. In seiner Funktion als Spleißfaktor bewirkt SXL die Bildung einer funktionellen mRNA des wiederum in beiden Geschlechtern aktiven *transducer-(tra-)*Gens (Sosnowski *et al.*, 1989). Das resultierende TRA-Protein ist ebenfalls ein Spleißfaktor und ist seinerseits erforderlich, um die weibliche Variante der *doublesex-(dsx-)*mRNA zu erzeugen (Hoshijima *et al.*, 1991). Die so hervorgebrachte weibliche Form des DSX-Proteins reprimiert Gene, die spezifisch für die männliche Entwicklung sind und aktiviert Gene der weiblichen Entwicklung. In Männchen dagegen wird eine Form des DSX-Proteins gebildet, die umgekehrt weibliche Gene reprimiert und männliche Gene aktiviert (Coschigano und Wensink, 1993; Jursnich und Burtis, 1993).

Ein Grund für das sehr frühe Einsetzen der *Sxl-Pe*-Transkription liegt in der Notwendigkeit, die X-chromosomale Dosiskompensation in weiblichen Embryonen vor Beginn der generellen Transkriptionsaktivität zu verhindern. Unter anderem in seiner Funktion als Translationsfaktor ist SXL hierfür verantwortlich, indem es die Translation der *male specific lethal-2*-mRNA verhindert (Kelley *et al.*, 1997). Die *male specific lethal*-Gene sind erforderlich, um im Zuge der Dosiskompensation in Männchen eine erhöhte Transkriptionsrate X-chromosomaler Gene zu erreichen. Allerdings verhindert SXL früh in der Embryogenese durch Assoziierung mit dem X-Chromosom die Dosiskompensation wohl auch direkt (Kelley *et al.*, 1995). Die

Bedeutung von SXL für die Regulation der Dosis-Kompensation bildet den Grund für die geschlechtsspezifische Letalität, die bei Störung der *Sxl*-Regulation auftritt. Wird in XX-Individuen kein SXL gebildet, kommt es aufgrund der eintretenden Dosiskompensation zu einer überhöhten Transkriptionsrate X-chromosomaler Gene. Wird umgekehrt in XY-Individuen fälschlicherweise SXL gebildet, kommt es zur Unterdrückung der Dosiskompensation und folglich zu einer verringerten Transkriptionsrate X-chromosomaler Gene.

Die Prozesse der Geschlechtsfestlegung in der Keimbahn unterscheiden sich von den hier vorgestellten Prozessen im Soma und sind noch nicht vollkommen verstanden (Übersichtsartikel von Schütt und Nöthiger, 2000). Jedoch liegt auch hier eine Beteiligung von *Sxl* vor.

Die nachfolgend beschriebenen Experimente zeigen eine funktionelle Analyse der BAP60-Untereinheit des Brahma-Komplexes. Durch Remobilisierung eines Transposons am *Bap60*-Locus wurde eine Nullmutante für *Bap60* erzeugt. Der durch Ausfall der maternalen bzw. zygotischen *Bap60*-Genfunktion resultierende Phänotyp ähnelt dem mutanten Phänotyp anderer Untereinheiten des Komplexes. Es wird dargestellt, dass (i) BAP60 an Prozessen der Genaktivierung beteiligt ist, die vom Brahma-Komplex vermittelt werden, dass (ii) BAP60 eine direkte oder indirekte Rolle im Aufbau heterochromatischer Strukturen spielt, und dass (iii) BAP60 über eine Domäne verfügt, die *in vitro* DNA bindet und *in vivo* mit Chromatin assoziiert. Schließlich werden genetische und physische Interaktionen zwischen BAP60 und den Transkriptionsfaktoren SISA und SC gezeigt. Diese deuteten auf eine direkte Beteiligung von BAP60 an der Aktivierung des frühen *Sxl*-Promotors hin. Auf der Basis der vorgestellten Resultate werden mögliche Funktionen von BAP60 innerhalb des Komplexes diskutiert.

2. Ergebnisse

Die BAP60-Untereinheit des Brahma-Komplexes stellt eine hochkonservierte Komponente SWI/SNF-artiger Komplexe dar. BAP60 wurde erstmals bei der Aufreinigung BRM-assoziiierter Proteine identifiziert (Papoulas *et al.*, 1998). Verschiedene BAP60-Peptidsequenzen stimmten mit Peptidsequenzen überein, die aus cDNA-Sequenzen abgeleitet wurden, welche im Rahmen des BDGP (*Berkeley Drosophila Genome Project*; Rubin *et al.*, 2000) generiert worden waren. Aufgrund dieser Übereinstimmungen war eine Zuordnung des BAP60-Proteins zu einer cDNA möglich, die für das vollständige Protein codiert (LD09078; Papoulas *et al.*, 1998). Aus der somit erhaltenen vollständigen Sequenz wurde die Verwandtschaft von BAP60 mit Untereinheiten SWI/SNF-artiger Komplexe aus Hefe und Mensch deutlich (vergleiche Tabelle 1-2). In Abb. 2-1 ist eine Gegenüberstellung der BAP60-Aminosäuresequenz und der Sequenz des homologen BAF60a-Proteins des Menschen zu sehen. Der Vergleich der Sequenzen verdeutlicht den hohen Konservierungsgrad dieser Untereinheit. Ein Ausschnitt der BAP60-Sequenz ist in Abb. 2-12 weiteren homologen Proteinen verschiedener eukaryotischer Organismen gegenübergestellt.

BAF60a	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
BAP60	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
BAF60a	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
BAP60	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
BAF60a	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
BAP60	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
BAF60a	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
BAP60	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
BAF60a	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
BAP60	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
BAF60a	459	469	479	489	499	509	519	529	539	549	559
BAP60	459	469	479	489	499	509	519	529	539	549	559

Abb. 2-1 Gegenüberstellung der BAP60-Aminosäuresequenz mit der Sequenz des homologen BAF60a-Proteins des Menschen. Die Sequenzidentität zwischen den Proteinen beträgt 75%, die Sequenzähnlichkeit 85%. Die Abgleichung der Sequenzpositionen erfolgte mit Hilfe des Algorithmus Clustal W 1.81 (Abschnitt 3.5). Die Sequenzen wurden über die Datenbank des *National Centers for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen. Identische Aminosäuren sind dunkelgrau, chemisch ähnliche Aminosäuren hellgrau unterlegt.

Der hohe Konservierungsgrad der BAP60-Untereinheit spricht für eine wichtige Rolle dieses Proteins im Organismus. Die Rekonstitution eines dem Brahma-Komplex homologen Komplexes aus heterolog exprimierten Untereinheiten zeigte jedoch, dass die humanen Orthologe von BRM, MOR und SNR1 bereits ausreichen, um *in vitro* eine nahezu volle Remodellierungsaktivität zu erreichen (Phelan *et al.*, 1999). Dieser minimale Komplex wurde daher als funktioneller Kern bezeichnet. Aus diesem Ergebnis ergibt sich direkt die Frage nach der Funktion der weiteren Untereinheiten des Komplexes. Ziel dieser Arbeit war es daher, die funktionelle Relevanz von BAP60 für den Komplex *in vivo* zu untersuchen, sowie Teilaspekte seiner Wirkungsweise aufzudecken.

2.1 Expressionsmuster der *Bap60*-mRNA

Die Analyse von Genexpressionsmustern erlaubt neben Aussagen über die Wirkungsorte der jeweiligen Genprodukte im Organismus auch Aussagen darüber, ob die Proteinprodukte der untersuchten Gene aufgrund einer Kolo-kalisation funktionell miteinander interagieren könnten. Dabei ist zu beachten, dass ein ermitteltes mRNA-Expressionsmuster nicht vollständig deckungsgleich mit dem Verteilungsmuster des zugehörigen Proteins sein muss. Dies gilt uneingeschränkt für sekretierte Proteine und für solche Proteine, deren mRNA innerhalb einer ausgedehnten Zelle (Neuronen) oder eines Synzytiums nur in bestimmten Regionen translatiert wird. Die Einschränkung gilt jedoch im Allgemeinen wegen der meist kurzen Lebensdauer von mRNA im Vergleich zu der von Proteinen. So kann das Proteinprodukt einer mRNA mitunter noch lange in einem Gewebe aktiv sein, nachdem die mRNA dort schon nicht mehr nachweisbar ist.

Um ein Bild vom räumlichen und zeitlichen Auftreten der *Bap60*-mRNA im *Drosophila*-Embryo zu erhalten und somit eine mögliche Kolo-kalisation von BAP60 mit anderen Komponenten des Brahma-Komplexes zu überprüfen, wurden *In-situ*-Hybridisierungen an Präparationen vollständiger Embryonen durchgeführt (Tautz und Pfeifle 1989; Abschnitt 3.2.3). Als Sonde in dieser Hybridisierung wurde *in vitro* transkribierte RNA verwendet, deren Sequenz der *Bap60*-cDNA LD09078 komplementär ist („antisense“-Sonde). Das Ergebnis der Hybridisierung (Abb. 2-2) deutet auf ein maternales *Bap60*-Transkript hin, das während der Oogenese in die

Eizelle eingelagert wird und zu einer starken ubiquitären Hybridisierungsfärbung im Blastodermstadium führt (Abb. 2-2A). Der maternale Ursprung dieser mRNA ergibt sich aus dem allgemeinen Fehlen starker zygotischer Transkription vor dem 14. Zellteilungszyklus (Edgar und Schubiger, 1986). Die maternale mRNA-Komponente von *Bap60* wird mit fortlaufender Embryonalentwicklung von einem zygotischen Transkript abgelöst (Abb. 2-2B), das in späteren Stadien auf Gehirn und Bauchmark des Embryos beschränkt bleibt (Abb. 2-2C).

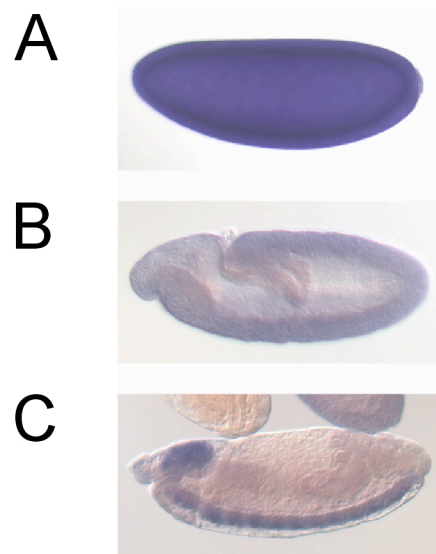


Abb. 2-2 Räumliche Verteilung der *Bap60*-mRNA während verschiedener Stadien der *Drosophila* Embryogenese. Das Muster der Expression wurde mittels *In-situ*-Hybridisierung einer markierten komplementären RNA an die native mRNA sichtbar gemacht. Die Embryonen sind mit ihrem anterioren Ende nach links und der Dorsalseite nach oben ausgerichtet. (A) Embryo des Blastodermstadiums mit ubiquitär verteiltem *Bap60*-Maternaltranskript. (B) Im Stadium des vollständig gestreckten Keimbandes beginnt das zygotische Transkript zu überwiegen. (C) Im späten Embryo (Stadium 13 nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) bleibt die Expression von *Bap60* auf das zentrale Nervensystem beschränkt.

2.2 Erzeugung einer *Bap60*-Nullmutante mittels impräziser P-Element-Exzision

Ein allgemein Anwendung findender Ansatz zur funktionellen Charakterisierung genomischer Komponenten liegt in der mutationsvermittelten Eliminierung ihrer Aktivität, gefolgt von einer detaillierten Untersuchung des resultierenden Phänotyps. Im Rahmen eines Projektes zur Erzeugung X-chromosomaler Insertionen eines

künstlichen, nicht-autonomen P-Element-Transposons wurde von U. Schäfer und seinen Mitarbeitern (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) eine P-Element-Insertion im Bereich des *Bap60*-Locus identifiziert (*G1131*). Diese Insertion diente als Ausgangspunkt für die Erzeugung einer *Bap60*-Nullmutante. Durch Einkreuzung einer Quelle der zur Remobilisierung erforderlichen Transposase ist es möglich, am Ort einer P-Element-Insertion Deletionen unterschiedlichen Ausmaßes zu erzeugen. Der Grund hierfür liegt in der geringen Schnittgenauigkeit der P-Element-Transposase; diese Ungenauigkeit bewirkt, dass in einigen Fällen flankierende genomische Bereiche bei der Exzision des Transposons mit verloren gehen (Tsubota und Schedl, 1986).

2.2.1 Lage der P-Element-Insertion *G1131*

Die Identifizierung des *Bap60*-Genlocus wurde durch die Sequenzierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* möglich (Adams *et al.*, 2000) und erfolgte auf der Grundlage bekannter cDNA-Sequenzen. Abb. 2-3 zeigt die genomische Organisation des *Bap60*-Locus. Die dargestellte Lage der Gene *Bap60* und *CG12096* inklusive der untranslatierten Regionen (UTR) und ihrer Intron-Exon-Grenzen basiert auf dem Vergleich verschiedener cDNA-Sequenzen mit der genomischen Sequenz der *Bap60*-Region.

Die Insertionsstelle des P-Elements *G1131* liegt innerhalb der 5'-UTR des Gens *CG12096*. Das putative Proteinprodukt dieses Gens zeigte in einer BLAST-Analyse (Abschnitt 3.5) die beste Übereinstimmung mit der S5-Untereinheit des humanen 26S-Proteasoms (E-Wert: 10^{-17} ; 23% Identität und 44% Ähnlichkeit). Der homozygote Insertionsstamm zeigt keinen mutanten Phänotyp, ist normal lebensfähig und fertil. Das insertierte P-Element verfügt über intrinsische *UAS*-Sequenzen, über die durch Kreuzung der Fliegen mit Fliegen eines *act-Gal4*-Treiberstamms eine ubiquitäre Überexpression benachbarter Gene erreicht werden kann (*UAS-Gal4*-System; Brand und Perrimon, 1993). Im Stamm *G1131* weisen die *UAS*-Sequenzen in Richtung auf das *Bap60*-Gen. Durch Kreuzung von *G1131*-Insertionsfliegen mit *act-Gal4*-Treiberfliegen ergaben sich jedoch keine offensichtlichen Defekte (U. Schäfer, persönliche Mitteilung).

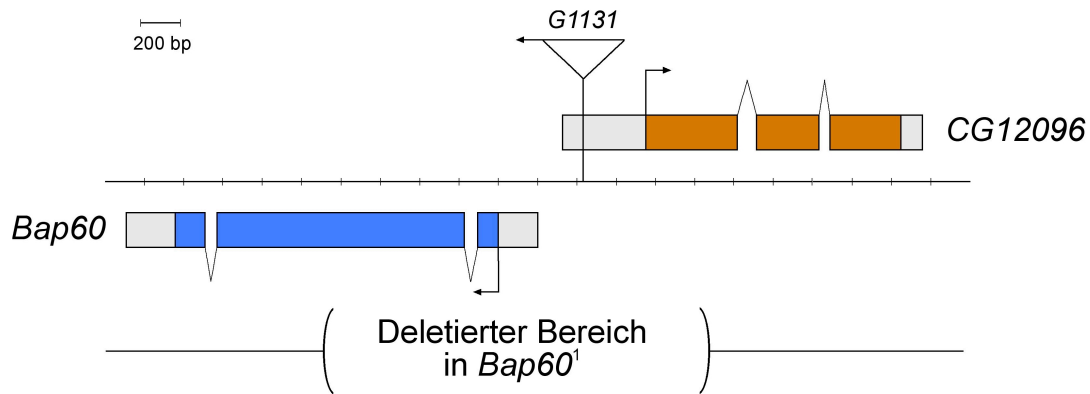


Abb. 2-3 Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *Bap60*-Locus und des Insertionsortes von *G1131*. Die Lage der Gene, ihrer Intron-Exon-Grenzen und untranslatierten Regionen basiert auf der Auswertung der cDNA-Sequenzen *LD46817* und *AT10854* für *CG12096* sowie der cDNA-Sequenz *LD09078* für *Bap60* (Berkeley *Drosophila* Genome Project, BDGP; <http://www.fruitfly.org>). Grundlage bildete die genomische Celera-Sequenz *AE003491.2* (Adams *et al.*, 2000). Die P-Element-Insertion *G1131* liegt 109 bp 3'-seitig vom mutmaßlichen Transkriptionsstart des Gens *CG12096*. Ebenfalls abgebildet ist der in *Bap60*¹ deletierte Sequenzbereich.

2.2.2 P-Element-Exzision

Zur Erzeugung flankierender Deletionen im Bereich der P-Element-Insertion *G1131* wurden homozygote *G1131*-Weibchen mit Männchen gekreuzt, die über eine Transposase-Quelle auf dem dritten Chromosom verfügten (Abb. 2-4; Abschnitt 3.1.1). Aus dieser Kreuzung hervorgegangene Weibchen, welche sowohl die ursprüngliche P-Element-Insertion trugen als auch das Transposase-Gen, wurden nun mit Männchen gekreuzt, die ein y-markiertes *FM7c*-Balancierchromosom trugen. In der nachfolgenden Generation konnten nun aufgrund des Verlustes des im P-Element enthaltenen y⁺-Markers solche Fliegen identifiziert werden, die kein vollständiges P-Element mehr enthielten. Sie fielen durch ihre gelbliche Körperfarbe deutlich auf. Insgesamt konnten 265 derartige Fliegen isoliert und für Einzelkreuzungen mit *FM7c*-Fliegen des jeweils anderen Geschlechts zur Etablierung einzelner Linien verwendet werden. Dabei zeigte sich, dass in zwei der Exzisionsstämme keine männlichen Fliegen ohne Balancierchromosom auftraten. Dies sprach für eine exzisionsbedingte Letalität.

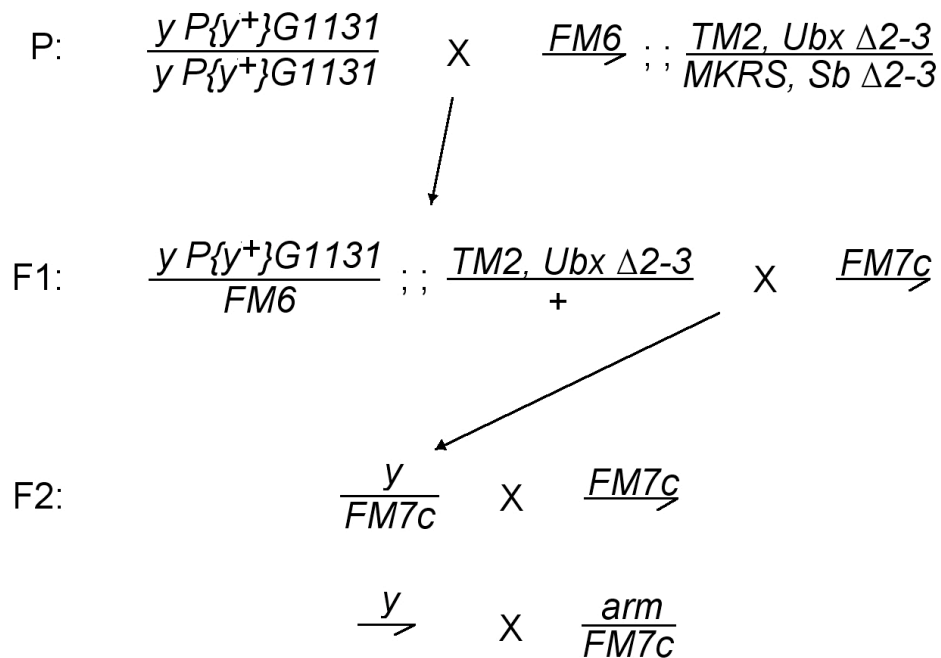


Abb. 2-4 Kreuzungsschema zur Erzeugung der *Bap60*-Nullmutante. In homozygote Weibchen des Insertionsstammes *G1131* wurde eine Quelle für das Transposase-Protein eingekreuzt (Parentalgeneration, P). Resultierende Weibchen, die sowohl ein Transposase-codierendes Chromosom als auch ein Insertionschromosom trugen, wurden gegen Männchen gekreuzt, die das *y*-markierte *FM7c*-Balancierchromosom trugen (Filialgeneration 1, F1). Aus der Nachkommenschaft dieser Kreuzung wurden jene Fliegen isoliert, welche den *y*⁺-Marker des P-Elements aufgrund einer Exzision nicht mehr aufwiesen. Diese Fliegen wurden zur Etablierung von Exzisionsstämmen mit *FM7c*-Fliegen gekreuzt (Filialgeneration 2, F2).

Um herauszufinden, ob die Letalität jeweils auf eine lokal begrenzte Deletion im Bereich der ursprünglichen P-Element-Insertionsstelle zurückgeht, wurden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) mit genomischer DNA heterozygoter Fliegen durchgeführt (Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2). Dabei wurden die Primer *Pr-CG4331* und *Pr-CG12096* verwendet, die im Wildtyp-Fall ein Amplifikat von ca. 8,2 kb erzeugen sollten. Bei einem der zwei Stämme mit hemizygoter Letalität ergab die PCR neben der Wildtyp-Bande des Balancierchromosoms auch eine um ca. 2 kb kleinere Bande. Da der Primer *Pr-CG12096* nur ca. 1 kb von der ursprünglichen Insertionsstelle entfernt liegt, sprach das Ergebnis dafür, dass mindestens 1 kb in Richtung auf *Bap60* hin deletiert sein müsste. Um die genaue Lage der Deletion festzustellen, wurde die verkürzte PCR-Bande nach Extraktion aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des Primers *Pr-CG12096* ansequenziert (Abschnitt 3.3.5). Aus der hierdurch erhaltenen Sequenz

ergab sich, dass tatsächlich eine 2-kb-Deletion vorlag. Sie reicht vom ersten Exon in *CG12096* bis in die Mitte des zweiten Exons von *Bap60* und schließt somit den Transkriptionsstart beider Gene sowie ihre Startcodons und mutmaßlichen Promotor-Regionen mit ein (siehe Abb. 2-3). Es ist daher davon auszugehen, dass durch die Deletion die Aktivität beider Gene vollständig unterdrückt ist.

2.2.3 Revertierung der Letalität durch transgene Expression von *Bap60*

Die durch Exzision der P-Element-Insertion *G1131* erzeugte Deletion im Bereich des *Bap60*-Locus schließt auch das Gen *CG12096* mit ein. Da die ursprüngliche P-Element-Insertion von insgesamt ca. 8,7 kb innerhalb der 5'-UTR dieses Gens lag, erscheint es wahrscheinlich, dass die Funktion von *CG12096* bereits im Insertionsstamm *G1131* beeinträchtigt war. Da dieser Stamm jedoch keinerlei phänotypische Auffälligkeiten zeigte, ist es denkbar, dass *CG12096* kein essenzielles Gen darstellt und die beobachtete Letalität der erzeugten Deletion gänzlich auf das Fehlen der *Bap60*-Genaktivität zurückzuführen ist.

Um eine Beteiligung fehlender *CG12096*-Aktivität an der Ausprägung des Letalitäts-Phänotyps jedoch sicher auszuschließen, wurde versucht männliche Fliegen, welche die letale Deletion tragen, durch transgene Expression von *Bap60* zur Lebensfähigkeit zu revertieren. Hierzu wurde die *Bap60*-cDNA *LD09078* unter die Kontrolle des Aktin-Promotors *ac5* gestellt (Chung und Keller, 1990; im Folgenden *act* genannt) und als Transgen mit Hilfe eines *w⁺*-markierten P-Elements in das *Drosophila*-Genom integriert (Abschnitt 3.1.2). Der Aktin-Promotor vermittelt weitestgehend ubiquitäre und konstitutiv aktive Expression eines durch ihn kontrollierten Gens. Aufgrund der vermuteten Funktion von BAP60 als genereller Transkriptionsfaktor wurde angenommen, dass eine solche allgemeine Expression im Organismus dem natürlichen Zustand ähnelt. Auch hatte die *act-Gal4*-vermittelte Überexpression von *Bap60* keinen negativen Effekt ergeben (siehe 2.2.1).

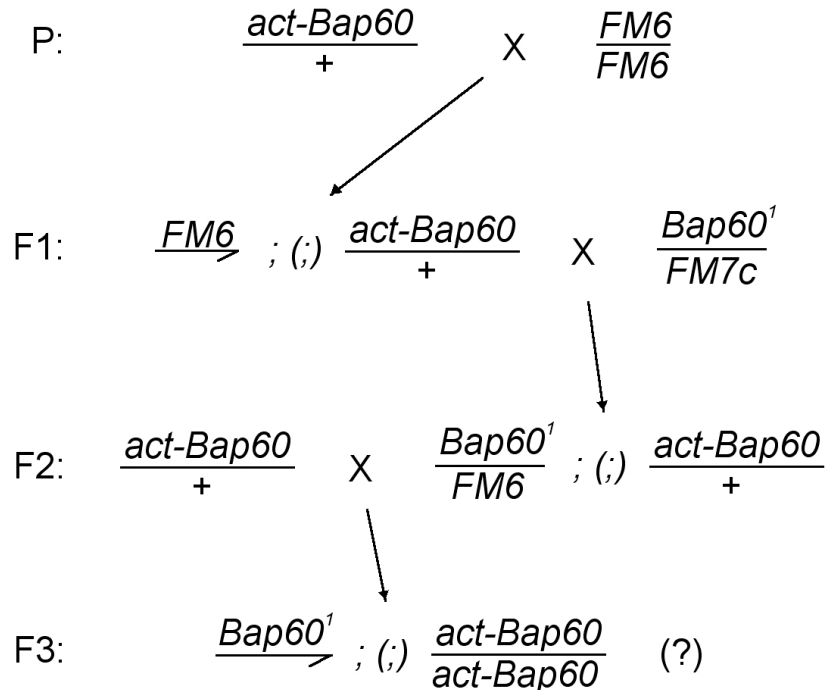


Abb. 2-5 Kreuzungsschema zur Revertierung der deletionsabhängigen Letalität durch transgene *Bap60*-Expression. Transgene Männchen eines *act-Bap60*-Insertionsstammes wurden mit homozygoten *FM6*-Weibchen gekreuzt (Parentalgeneration, P). Aus dieser Kreuzung hervorgehende Männchen, die sowohl das *FM6*-Balancierchromosom als auch das Transgen enthielten, wurden nun gegen Weibchen des Exzisionsstamms gekreuzt (Filialgeneration 1, F1). Es ergaben sich Weibchen, die außer der Deletion am *Bap60*-Locus auch eine *act-Bap60*-Insertion trugen. Diese wurden nun abermals mit Männchen des ursprünglichen *act-Bap60*-Insertionsstammes gekreuzt (Filialgeneration 2, F2). In der Nachkommenschaft dieser Kreuzung wurde nach männlichen Fliegen gesucht, welche das deletionsstragende Chromosom trugen (Filialgeneration 3, F3). Bei einem der überprüften *act-Bap60*-Insertionsstämme zeigten sich solche Männchen bereits in der zweiten Filialgeneration. Hier reichte also bereits eine Kopie des Transgens aus, um eine Revertierung der Letalität zu bewirken. Das deletionsstragende Chromosom konnte direkt über seinen y-Marker (nicht mit abgebildet) und indirekt über das Fehlen der Marker der *FM6*- und *FM7c*-Balancierchromosomen verfolgt werden. Das *act-Bap60*-Transgen konnte über seinen *w*⁺-Marker verfolgt werden (nicht mit abgebildet).

Es wurden neun unabhängige transgene *act-Bap60*-Insertionen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den durch das Exzisionsschromosom bewirkten Letalitäts-Phänotyp in männlichen Fliegen zu unterdrücken (Abb. 2-5). Tatsächlich waren vier der neun Transgene hierzu in der Lage. Bei einer *act-Bap60*-Insertion reichte bereits eine

Kopie des Transgens zur Unterdrückung der Letalität aus. Wahrscheinlich bewirkte ein vorteilhafter Integrationsort in diesem Fall eine besonders hohe Transkriptionsaktivität. Die geretteten Männchen waren phänotypisch unauffällig und fertil. Da somit allein die transgene Expression von *Bap60* ausreicht, um den Letalitäts-Phänotyp der erzeugten Deletion zu unterdrücken, kann davon ausgegangen werden, dass die Letalität der Deletion im hemizygoten Zustand allein auf die fehlende *Bap60*-Genaktivität zurückgeht. Im Folgenden wird diese Deletion als *Bap60^l* bezeichnet.

2.3 Phänotypische Charakterisierung von *Bap60^l*

2.3.1 Bestimmung des Letalitätszeitpunktes von *Bap60^l*

Um festzustellen, in welchem Stadium der Entwicklung die *Bap60^l*-abhängige Letalität auftritt, wurden zunächst nach Auskreuzung des *FM7c*-Balancierchromsoms Eiablagen einer Kreuzung von *Bap60^l*-Weibchen mit Wildtyp-Männchen analysiert. Hierzu wurden Ablageplatten (Abschnitt 3.2.1) nach Entfernen der adulten Fliegen noch ein bis zwei Tage bei 25°C weiterinkubiert und anschließend der Prozentsatz ungeschlüpfter Embryonen bestimmt. Geschlüpfte Larven hinterlassen klar erkennbare, leere Eihüllen. Bei 25°C schlüpfen die Larven normalerweise nach 24 Stunden. Nach ein bis zwei Tagen sollten daher alle Larven geschlüpft sein.

Das Ergebnis der Auszählung ist in Tabelle 2-1 zu sehen. Der Prozentsatz von 25% ungeschlüpfte Embryonen entspricht der erwarteten Häufigkeit der *Bap60^l*-Männchen. Um dieses Ergebnis einer embryonalen Letalität von *Bap60^l* auf unabhängigem Wege zu überprüfen, wurde der Stamm *Bap60^l/FM7c* auf das Balancierchromosom *FM7i*, *act-GFP* umbalanciert. Dieses Chromosom führt durch Expression des grün fluoreszierenden Proteins GFP dazu, dass Larven, die mindestens ein Balancierchromosom tragen, aufgrund ihrer Fluoreszenz identifiziert werden können. Männliche *Bap60^l*-Larven waren daher durch ihre fehlende Fluoreszenz zu erkennen. Es wurden wiederum Ablageplatten angesetzt und diese nach Entfernen der adulten Fliegen unterschiedlich lange bei 25°C weiterinkubiert. Anschließend wurde der Anteil nichtfluoreszierender Larven bestimmt (Tabelle 2-2). Es zeigte sich, dass nur ca. ein Drittel der zu erwartenden männlichen *Bap60^l*-Larven auch tatsächlich auftraten (7% nicht fluoreszierende Larven von erwarteten 25%). Darüber hinaus

2. Ergebnisse

erschieden diese geschlüpften nichtfluoreszierenden Larven kleiner und weniger agil als die fluoreszierenden Larven. Wurde die Auswertung nach 56 h und 74 h durchgeführt, waren schließlich keine nichtfluoreszierenden Larven mehr zu finden. Das prinzipielle Auftreten männlicher *Bap60^l*-Larven deutet jedoch darauf hin, dass die *Bap60^l*-abhängige Letalität erst spät in der Embryonalentwicklung einsetzt.

Tabelle 2-1 Bestimmung des Letalitätszeitpunktes von *Bap60^l*-Männchen durch Auswertung des Anteils nichtschlüpfender Embryonen.

Zeit nach Ablageende [h]	Eier insgesamt	ungeschlüpft	%
29	205	52	25,4
27	83	28	33,7
40	160	26	16,3
28	166	33	19,9
46	200	60	30,0
Ø 25 %			

Ablageplatten einer Kreuzung von unbalancierten *Bap60^l*-Weibchen mit Wildtyp-Männchen wurden auf den Anteil nichtschlüpfender Embryonen hin untersucht.

Tabelle 2-2 Bestimmung des Letalitätszeitpunktes von *Bap60^l*-Männchen durch Auswertung des Anteils nichtfluoreszierender Larven.

Zeit nach Ablageende [h]	Larven insgesamt	nichtfluoreszierend	%
27	122	12	9,8
41	241	14	5,8
42	121	6	5,0
26	258	19	7,4
Ø 7 %			

Ablageplatten eines *Bap60^l/FM7c*, *act-GFP*-Stammes wurden auf den Anteil nichtfluoreszierender Larven hin untersucht.

2.3.2 Analyse von Kutikula, Nervensystem und Muskulatur

Die Auswertung der Versuche zur Bestimmung des Letalitätszeitpunktes von *Bap60^l* ergab, dass hemizygote *Bap60^l*-Männchen zwar größtenteils bereits als Embryonen absterben, dass einige von ihnen jedoch durchaus das erste Larvenstadium erreichen können. Um den Grund dieser somit erst recht spät einsetzenden Letalität zu ermitteln, wurde als erstes die Kutikula ungeschlüpfter Larven auf phänotypische Besonderheiten hin untersucht. Dies erschien besonders deshalb sinnvoll, weil mehrere Untereinheiten des Brahma-Komplexes als Gene der Trithorax-Gruppe identifiziert worden waren (Kennison und Tamkun, 1988) und *brm* in der korrekten Aktivierung homöotischer Gene des Antennapedia- und des Bithorax-Komplexes eine Rolle spielt (Tamkun *et al.*, 1992).

Nach Auskreuzung des *FM7c*-Balancierchromosoms wurden Eiablagen einer Kreuzung von *Bap60^l*-Weibchen mit Wildtyp-Männchen angesetzt und die Ablageplatten nach Entfernen der adulten Fliegen noch 30 h bei 25°C weiterinkubiert. Nach Entfernen aller freiwandernden Larven wurden die Kutikulae der ungeschlüpften Larven präpariert (Abschnitt 3.2.5) und mikroskopisch betrachtet. Die untersuchten Kutikulae zeigten jedoch keinerlei Abnormalitäten der Segmentidentitäten oder anderer Strukturen.

Die starke Expression von *Bap60* im zentralen Nervensystem später Stadien der Embryonalentwicklung deutet auf eine mögliche Funktion von BAP60 im Nervensystem und der Muskelausbildung hin. Daher wurde als nächstes untersucht, ob Defekte im Nervensystem oder in der Muskulatur später Embryonen vorliegen, die ein Schlüpfen der Larven unmöglich machen bzw. erschweren und auch den frühen Tod geschlüpfter Larven erklären könnten. Hierzu wurden Antikörperfärbungen an fixierten Embryonen des *Bap60^l/FM7c*-Stammes durchgeführt (Abschnitt 3.2.4). Die Strukturen des peripheren Nervensystems wurden mit Antikörpern gegen das neurale Zelladhäsionsprotein Fasciclin II (van Vactor *et al.*, 1993) und gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein Futsch/22C10 (Fujita *et al.*, 1982; Hummel *et al.*, 2000) sichtbar gemacht. Die larvale Muskulatur wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen die schwere Kette des Myosins sichtbar gemacht (Kiehart und Feghali, 1986). Sowohl Nervensystem als auch Muskulatur aller späten Embryonen dieses Stammes

wiesen jedoch eine normale Ausbildung auf. Es konnte somit kein Entwicklungsdefekt in den Embryonen identifiziert werden, der die Letalität erklären würde.

2.3.3 Auswirkung von *Bap60^l* in der weiblichen Keimbahn

Das Vorhandensein einer maternalen *Bap60*-mRNA-Komponente im frühen Embryo (vergleiche Abschnitt 2.1) zeigt an, dass die Ausschaltung des zygotischen *Bap60*-Genproduktes durch Hemizygotie für *Bap60^l* nicht zu einem vollständigen Fehlen des BAP60-Proteins im Embryo führen kann. Das durch Translation der maternalen mRNA gebildete BAP60 verhindert somit eine Aufschlüsselung der BAP60-Funktion in der frühen Embryonalentwicklung. Auch eine etwaige Rolle von BAP60 in der Festlegung der Segmentidentitäten durch Kontrolle homöotischer Gene könnte daher allein durch den Ausfall zygotischer *Bap60*-Funktion nicht festgestellt werden. Um ein vollständigeres Bild von den Funktionen des *Bap60*-Genproduktes im Embryo zu erhalten, wurden daher mit Hilfe der FLP-DFS-Methode (Chou und Perrimon, 1996) homozygote *Bap60^l*-Klone in der Keimbahn heterozygoter *Bap60^l*-Weibchen erzeugt (Abb. 2-6; Abschnitt 3.1.3).

Nach Kreuzung dieser Weibchen mit Wildtyp-Männchen sollte die Entwicklung der resultierenden Embryonen erneut untersucht werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Weibchen kaum Eier legten. Die wenigen Eier, welche abgelegt wurden, erschienen zum Teil deformiert oder ohne Inhalt. Aus ihnen schlüpften keine Larven, Kutikulae wurden nicht gebildet. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass BAP60 an der Oogenese selbst beteiligt ist. Damit ist ein Ausfall des *Bap60*-Gens in der weiblichen Keimbahn ebenfalls nicht dazu geeignet, eine spezifische Funktion des Proteins in der frühen Embryonalentwicklung zu ergründen.

Die Untersuchungen sowohl zygotischer als auch maternaler *Bap60*-Mutanten ergaben keine Entwicklungsdefekte, die über die bekannten Defekte hinausgehen, welche bei Mutation anderer Untereinheiten des Brahma-Komplexes zu beobachten sind. Die Defekte zeigen allerdings, dass BAP60 zumindest für einige Funktionen des Komplexes essenziell ist. Der Phänotyp des zygotischen Ausfalls von BAP60 könnte auf einer Beteiligung von BAP60 an vitalen Zellfunktionen beruhen. BAP60-

defizitären Zellen bliebe in einem solchen Fall eine normale Weiterentwicklung versagt.

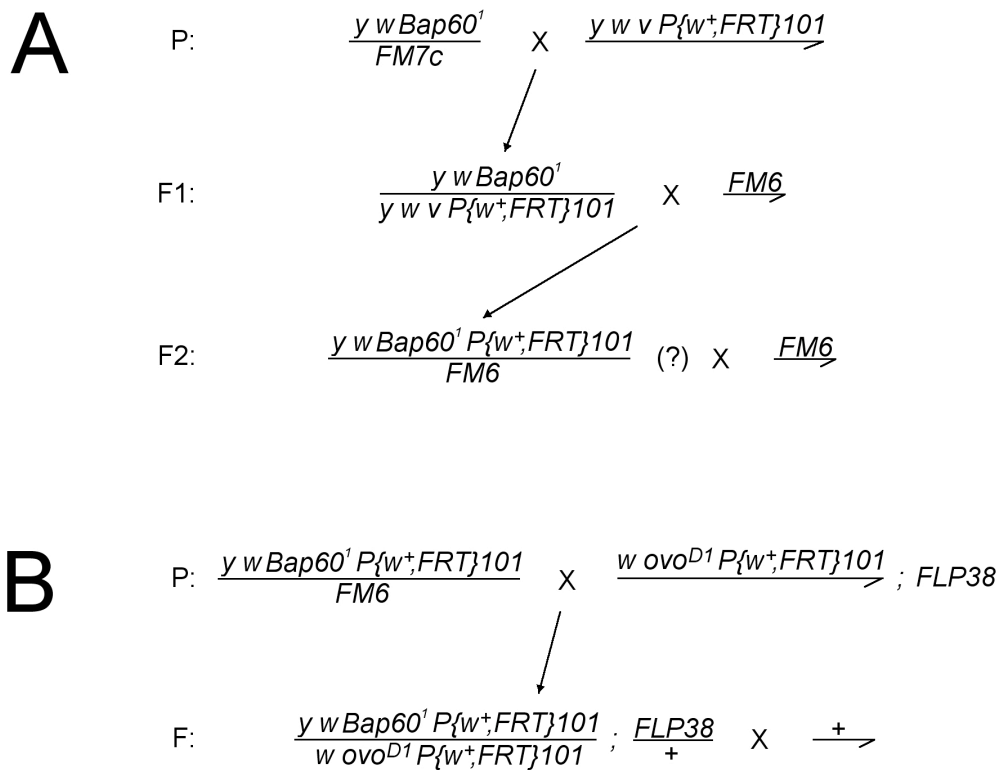


Abb. 2-6 Kreuzungsschema zur Erzeugung homozygoter *Bap60^l*-Klone in der Keimbahn heterozygoter *Bap60^l*-Weibchen mit Hilfe der FLP-DFS-Methode. (A) Rekombination von *Bap60^l* auf ein FRT-tragendes Chromosom. Die FRT-Sequenzen dienen dem späteren Austausch von Chromosomenabschnitten in der FLP-abhängigen mitotischen Rekombination. Die erfolgreiche Rekombination von *Bap60^l* und FRT-Sequenz auf ein Chromosom zeigte sich in der dritten Filialgeneration (nicht abgebildet) durch Auftreten des *w⁺*-Markers der FRT-Insertion und durch die *Bap60^l*-bedingte Letalität der männlichen Fliegen, welche das rekombinante Chromosom tragen. (B) Erzeugung homozygoter *Bap60^l*-Keimbahnklone. Weibchen des *Bap60^l*, *FRT¹⁰¹*-Stammes wurden mit Männchen eines *ovo^{Dl}*, *FRT¹⁰¹*-Stammes gekreuzt, die gleichzeitig homozygot für ein Hitzeschock-induzierbares Flippase-Gen waren (Parentalgeneration, P). Larven, die aus dieser Kreuzung resultierten, wurden am zweiten und dritten Tag nach Beginn der Ablage für 1 h bei 38°C einem Hitzeschock im Wasserbad ausgesetzt. Weibchen dieser Generation, die kein *FM6*-Balancierchromosom trugen, wurden schließlich gegen Wildtyp-Männchen gekreuzt (Filialgeneration, F). Nur bei rekombinationsbedingtem Verlust des dominanten weiblichen Sterilitätsallels *ovo^{Dl}* in der Keimbahn unter gleichzeitiger Bildung homozygoter *Bap60^l*-Klone ist das Auftreten fertiler Weibchen möglich. Alle beobachteten Eier müssen daher aus homozygoten *Bap60^l*-Keimbahnklonen hervorgegangen sein.

2.4 Genetische Studien zur Funktion von *Bap60*

2.4.1 Genetische Interaktion mit anderen Untereinheiten des Brahma-Komplexes

Die Folgen eines Ausfalls der zygotischen oder maternalen Funktion von *Bap60* ließen bereits auf eine wichtige Funktion von BAP60 *in vivo* schließen. Daher sollte untersucht werden, ob eine verringerte BAP60-Konzentration in Verbindung mit Mutationen anderer Untereinheiten des Brahma-Komplexes zu Abnormalitäten führen, die weitere Aufschlüsse über die Bedeutung von BAP60 für den Komplex zulassen.

Tabelle 2-3 Genetische Interaktion zwischen *Bap60^l* und Mutanten verschiedener Untereinheiten des Brahma-Komplexes.

Genotyp	Kontrolle	<i>Bap60^l</i>
<i>Bap60^l/+ ; ; brm²/+</i>	20/292 (7%)	44/321 (14%)
<i>Bap60^l/+ ; ; brm², trx^{E2}/+</i>	6/128 (5%)	52/351 (15%)
<i>Bap60^l/+ ; ; trx^{E2}/+</i>	nicht durchgeführt	0/162 (0%)
<i>Bap60^l/+ ; ; mor¹/+</i>	8/281 (3%)	25/357 (7%)
<i>Bap60^l/+ ; ; osa²/+</i>	nicht durchgeführt	0/118 (0%)
<i>Bap60^l/+ ; ; snr1^{R3}/+</i>	1/111 (1%)	2/82 (2%)
Der ausgewertete Phänotyp war der Verlust von mindestens einer humeralen Makrochäte. Als Kontrolle dienten Fliegen des jeweils gleichen Genotyps ohne <i>Bap60^l</i> .		

Um genetische Interaktionen zwischen *Bap60* und anderen Untereinheiten des Komplexes aufzudecken, wurden Fliegen untersucht, die sowohl heterozygot für *Bap60^l* als auch für Mutationen der Untereinheiten *brm*, *mor*, *snr1* oder *osa* waren. Zusätzlich wurde die Transheterozygotie mit *trx* untersucht. Keine dieser transheterozygoten Fliegen wiesen jedoch größere Abnormalitäten auf. Daher wurde der von Mutationen des *brm*-Gens her bekannte Phänotyp eines Verlustes humeraler Borsten näher untersucht (Brizuela *et al.*, 1994). Der Verlust humeraler Makrochäten bei heterozygoten *brm*-Mutanten wird durch gleichzeitige Heterozygotie von *Bap60^l*

verstärkt (Tabelle 2-3). Ein ähnlicher Effekt, allerdings in geringerem Maße, wird in der Kombination mit *mor*-Mutanten beobachtet. Der Verlust humeraler Borsten ist ein bekannter Phänotyp verschiedener *Antennapedia*-Mutationen (Abbott und Kaufman, 1986). Das Ergebnis weist daher darauf hin, dass BAP60 an der Brahma-Komplex-abhängigen Aktivierung von *Antennapedia* oder eines seiner Zielgene beteiligt sein könnte.

2.4.2 Untersuchung der Funktion von *Bap60* in der Aktivierung von *Antp*

Um eine direkte Beteiligung von *Bap60* an der Brahma-Komplex-abhängigen Aktivierung von Genen zu überprüfen, wurde der Einfluss von *Bap60^l* auf die Aktivierung des *Antennapedia*-Gens (*Antp*) untersucht. Im *Nasobemia*-Allel von *Antp* (*Antp^{NS}*) ist der *Antp*-Promotor *P2* aufgrund einer Transposoninsertion in der Augen-Antennen-Imaginalscheibe dereprimiert (Jorgensen und Garber, 1987), was zu einer ektopischen Expression von *Antp* führt. Die Folge ist eine homöotische Transformation der Antennen in Beine. *brm* war ursprünglich aufgrund der Fähigkeit seiner Mutationsallele identifiziert worden, die *Antp^{NS}*-abhängige homöotische Transformation der Antennen zu unterdrücken (Kennison und Tamkun, 1988).

Die Fähigkeit zur Supprimierung der *Antp^{NS}*-assoziierten Antennen-Transformation ist seither benutzt worden, um die Beteiligung von *brm*, *mor*, *snr1* und *osa* an der Aktivierung von *Antp* zu zeigen (Tamkun *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1999; Brizuela und Kennison, 1997; Zrally *et al.*, 2003). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die beobachteten Interaktionen spezifisch für den *Antp*-Promotor sind und nicht etwa auf eine Interaktion des ANTP-Proteins mit dem Brahma-Komplex bei der Aktivierung von *Antp*-Zielgenen zurückzuführen sind. Dies war dank des *Antp^{73b}*-Allels möglich, das die gleiche Art homöotischer Transformation aufgrund einer Fusion des offenen Leserahmens von *Antp* mit einem Promotor bewirkt, der spezifisch für die Augen-Antennen-Imaginalscheibe ist (Frischer *et al.*, 1986; Schneuwly *et al.*, 1987). Weder Mutanten von *brm*, *mor*, *snr1* noch von *osa* bewirken eine Supprimierung der *Antp^{73b}*-abhängigen Transformation.

Die Auswirkungen von *Bap60^l* auf die *Antp^{NS}*- und auf die *Antp^{73b}*-abhängige Antennen-Transformation sind in Tabelle 2-4 zusammengefasst. *Bap60^l* bewirkt eine Reduktion der *Antp^{NS}*-abhängigen Transformation, während Transformationen, die

2. Ergebnisse

durch *Antp*^{73b} verursacht werden, nicht beeinflusst sind. Der beobachtete Effekt ist allerdings deutlich geringer als der vergleichbare Effekt der *mor*^l-Mutation. Die Ergebnisse zeigen, dass auch *Bap60* an der Brahma-Komplex-abhängigen Aktivierung des *Antp*-P2-Promotors beteiligt ist.

Tabelle 2-4 Auswirkung von *Bap60*^l auf die Penetranz der Transformation von Antenne zu Bein in *Antp*^{NS} und in *Antp*^{73b}.

Genotyp	Häufigkeit der Transformation
<i>Antp</i> ^{NS} /+	362/363 (100%)
<i>Bap60</i> ^l /+ ;; <i>Antp</i> ^{NS} /+	157/171 (92%)
<i>Antp</i> ^{73b} /+	135/135 (100%)
<i>Bap60</i> ^l /+ ;; <i>Antp</i> ^{73b} /+	104/104 (100%)
<i>mor</i> ^l / <i>Antp</i> ^{NS}	30/67 (45%)

Ausgewertet wurde das Erscheinen nicht-antennaler Strukturen an den Antennen. *mor*^l wurde zur Kontrolle ebenfalls untersucht; der Literaturwert für die Transformationshäufigkeit in *mor*^l/*Antp*^{NS}-Fliegen liegt bei 6% (Brizuela und Kennison, 1997).

2.4.3 Untersuchung der Rolle von *Bap60* in der Positionseffekt-Variegation

Um zu ermitteln, ob *Bap60* neben der aktivierenden Funktion auch eine repressive Funktion ausüben kann, wurde der Effekt von *Bap60*^l auf das Phänomen der Positionseffekt-Variegation (PEV) untersucht. Es wird angenommen, dass die PEV auf der zellautonomen Abschaltung („Silencing“) von euchromatischen Genen durch Ausbreitung benachbarten Heterochromatins basiert, wodurch das betreffende Gen in einigen Zellen aktiv, in anderen dagegen inaktiv ist (Tartof *et al.*, 1984). Die PEV tritt unter anderem auf, wenn durch Verlagerung oder Inversion ein eigentlich euchromatisches Gen in eine heterochromatische Umgebung gelangt und letztere wohl durch Wegfall von Grenzelementen nicht mehr streng kontrolliert wird (Locke *et al.*, 1988). Durch Veränderung des Expressionsniveaus oder der Funktionsfähigkeit von Komponenten, die an der Ausbildung von Heterochromatin oder an der Aktivierung eines der PEV unterworfenen Gens beteiligt sind, kann das Ausmaß der

PEV modifiziert werden. Daher kann die PEV benutzt werden, um die Beteiligung eines Gens an der Bildung von Heterochromatin (Supprimierung der PEV bei Verringerung der Gendosis) oder an der Genaktivierung (Verstärkung der PEV bei Verringerung der Gendosis) nachzuweisen.

Das Inversionschromosom *In(1)w^{m4h}* enthält einen *white*-Locus, der in die Gegend centromerischen Heterochromatins transloziert ist. Aufgrund der daraus resultierenden Abschaltung des *white*-Gens in einigen Ommatidien des Auges ergibt sich eine variierte Augenfarbe (Abb. 2-7A; Dorn *et al.*, 1993; Reuter und Wolff, 1981; Wallrath und Elgin, 1995). Ist die betreffende Fliege jedoch gleichzeitig heterozygot für *Bap60^l*, so zeigt sich ein normalfarbiges Auge (Abb. 2-7B). Die verringerte *Bap60*-Gendosis führt somit zu einer Supprimierung der *In(1)w^{m4h}*-abhängigen *white*-Variegation. Dies zeigt, dass BAP60 an der korrekten Ausbildung heterochromatischer Strukturen beteiligt ist.

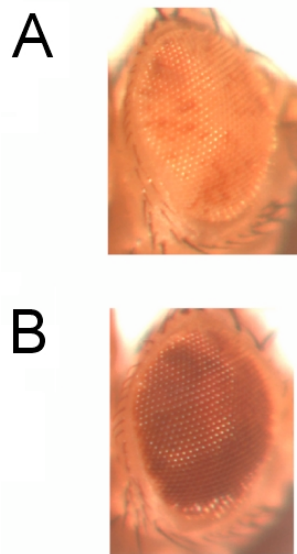


Abb. 2-7 Auswirkung von *Bap60^l* auf die Heterochromatin-vermittelte Positioneffekt-Variegation. (A) Auge einer weiblichen Fliege mit dem Genotyp *In(1)w^{m4h}/w*. Das Auge zeigt variierte *white*-Expression. (B) Auge einer weiblichen Fliege mit dem Genotyp *In(1)w^{m4h}/w, Bap60^l*. Die Anwesenheit der *Bap60^l*-Mutation stellt die normale Expression von *white* wieder her und supprimiert daher den variierten Phänotyp des *In(1)w^{m4h}*-Inversionschromosoms.

2.5 Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von BAP60

2.5.1 Feststellung der DNA-Bindung

In einer Arbeit, welche die DNA-Bindungseigenschaften des SWI/SNF-Komplexes der Hefe untersuchte, war eine ~68-kd-Untereinheit identifiziert worden, die durch Einwirkung von UV-Strahlung kovalent an DNA gebunden werden konnte (Quinn *et al.*, 1996). Aufgrund ihres Molekulargewichtes ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die SWP73-Untereinheit des Komplexes handelte (Cairns *et al.*, 1994; Cote *et al.*, 1994). SWP73 ist neben RSC6 als eines der BAP60-homologen Proteine der Hefe bekannt (Papoulas *et al.*, 1998). Weder SWP73 noch BAP60 enthalten jedoch bekannte DNA-Bindungsmotive, so dass sich die Frage stellte, ob die beobachtete Möglichkeit der UV-Licht-vermittelten Querverbindung von SWP73 und DNA tatsächlich auf einer stabilen Wechselwirkung beruht.

Um die Fähigkeit BAP60-homologer Proteine zur direkten Interaktion mit DNA zu untersuchen, wurden Versuche durchgeführt, die auf der Co-Präzipitation von Protein-gebundener DNA basieren (Abb. 2-8; Abschnitt 3.4.4). Zu diesem Zweck wurde fragmentierte Plasmid-DNA radioaktiv markiert und mit einem Fusionsprotein von BAP60 und der *E. coli* Glutathion-S-Transferase (GST) inkubiert. Mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch mit der GST reagiert, wurden möglicherweise vorhandene BAP60-DNA-Komplexe an eine Agarose-Matrix gebunden. Anschließend wurde mit Pufferlösungen ansteigender Salzkonzentration gewaschen, die Matrix-Überstände einer Ethanol-fällung unterzogen, die resuspendierten Niederschläge schließlich auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und eventuell enthaltene DNA aufgetrennt. Die DNA wurde autoradiographisch sichtbar gemacht. Als Kontrollen dienten zum einen reine GST, von der keine DNA-Bindung erwartet wurde, zum anderen ein Fusionsprotein der GST und der Homöodomäne des *bicoid*-Genproduktes (GST-BCD-HD), welches unter den Versuchsbedingungen DNA-Bindung zeigen sollte. Das Ergebnis des Versuches ist in Abb. 2-9 dargestellt.

Während im Falle einer DNA-Inkubation mit der reinen GST die DNA-Fragmente bereits mit dem Bindungspuffer (100 mM NaCl) heruntergewaschen werden können, ist GST-BAP60 in der Lage, die DNA-Fragmente auch bei erhöhten Salzkonz-

zentrationen zurückzuhalten (300-500 mM NaCl). Somit ist BAP60 zu einer direkten und stabilen Wechselwirkung mit DNA in der Lage.

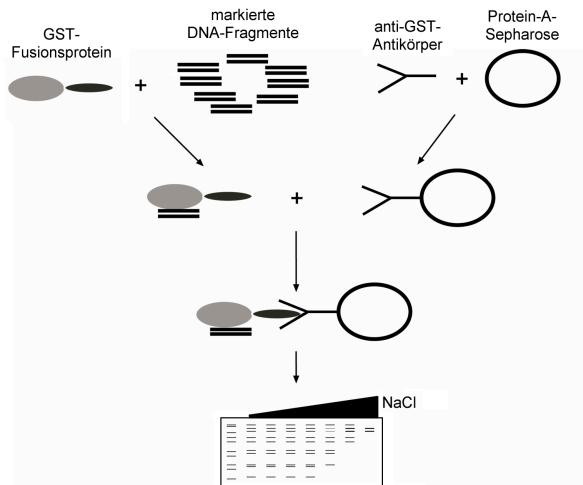


Abb. 2-8 Schema der DNA-Co-Immunpräzipitation. Terminal [^{33}P]-markierte DNA-Fragmente wurden mit GST oder GST-Fusionsproteinen inkubiert. Parallel wurde gegen GST gerichteter Antikörper an eine Protein-A-Agarose-Matrix gebunden. Die DNA-Bindungsreaktion wurde anschließend mit der Antikörper-Matrix zusammengebracht und letztere mit Pufferlösungen ansteigender Salzkonzentration gewaschen. Nach Ethanolfällung der Matrixüberstände eines jeden Waschschrittes und der anschließenden Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Polyacrylamid-Gel konnte autoradiographisch festgestellt werden, bei welchen Salzkonzentrationen die DNA-Fragmente jeweils eluierten.

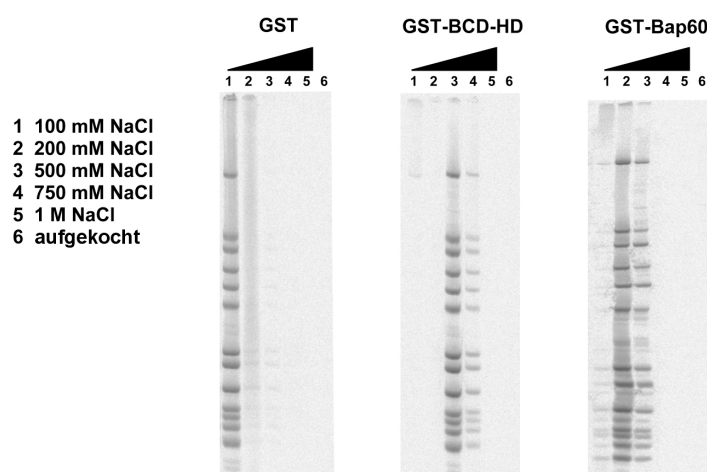


Abb. 2-9 Ergebnis der DNA-Co-Immunpräzipitation zur Feststellung einer etwaigen DNA-Bindungsaktivität von BAP60. Zur Durchführung vergleiche Abb. 2-8. GST-BAP60 ist in der Lage, DNA-Fragmente auch bei erhöhten Salzkonzentrationen zurückzuhalten. GST diente als Negativkontrolle, die Homöodomäne des *bicoid*-Genproduktes (GST-BCD-HD) als Positivkontrolle für DNA-Bindung.

2.5.2 Identifizierung einer DNA-Bindungsdomäne in BAP60

Um festzustellen, ob die beobachtete DNA-Bindungsaktivität einem bestimmten Teil von BAP60 zugeordnet werden kann, wurden verschiedene Fragmente der BAP60-Sequenz jeweils an die GST fusioniert und dem gleichen Versuchsablauf unterzogen wie unter 2.5.1 dargestellt. Abb. 2-10 zeigt eine schematische Übersicht der überprüften Fragmente und das jeweilige Ergebnis der DNA-Co-Immuno-präzipitation. Die DNA-Bindungsaktivität konnte einem Bereich in der N-terminalen Hälfte des Proteins zugewiesen werden. Das kleinste überprüfte Sequenzintervall mit DNA-Bindungsaktivität umfasste die Aminosäuren 116 bis 204 (Abb. 2-11). Da es sich hierbei somit um ein DNA-Bindungsmotiv mit der Fähigkeit zur eigenständigen Faltung handelt, wird der Sequenzbereich im Folgenden als DNA-Bindungsdomäne (DBD) bezeichnet.

Fragment		Bindung
1-515		+
128-515		-
1-227		+
128-227		-
98-227		+
98-204		+
116-204		+

Abb. 2-10 Identifizierung DNA-bindender Fragmente von BAP60. GST-Fusionsproteine verschiedener BAP60-Fragmente wurden in einer DNA-Co-Immunopräzipitation wie in Abb. 2-8 untersucht. Fragmente, bei denen DNA-Bindung festgestellt werden konnte, sind mit einem Pluszeichen markiert (+). Fragmente, bei denen keine DNA-Bindung festgestellt werden konnte, sind mit einem Minuszeichen markiert (-). Das kürzeste untersuchte Sequenzintervall, das DNA-Bindung zeigt, besteht aus den Aminosäuren 116 bis 204.

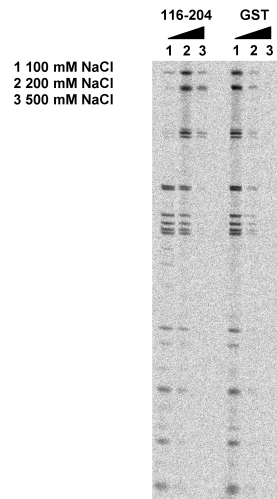


Abb. 2-11 Identifizierung einer DNA-bindenden Domäne in BAP60. Das BAP60-Sequenzintervall der Aminosäuren 116 bis 204 reicht aus, um in der DNA-Co-Immunopräzipitation eine Retention von DNA zu bewirken (vergleiche Abb. 2-8 und 2-10).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
<i>H. sapiens</i>	PMPAQRRL--KRRMADKVLQRIRELVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KKPLTGK-----	RKLRIYISNTESPSK--AEG--SSAGT								
	TAPARSGA--KRRMADKVLQRIRELVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KRPKQK-----	RKLRLYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>D. melanogaster</i>	AVQNNHNA--KRRMADKVLQRIRELVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KRPKQK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
	AGKSDFTAKKKKLAELKLPQKVRDLVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KRPKQK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>A. gambiae</i>	AQKNDYSV--KRRMADKVLQRIRELVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KRPKQK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
	PSSGSEYQ--KRRMADKVLQRIRELVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KRPKQK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>C. intestinalis</i>	ADIRNKQVTKKKKLSKVLQKVRDLVPESQAYMDLLAFERKLDQTIARRKMEIQEAL	-----KRPVVK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>C. elegans</i>	MLTPAAARNRKRLPEKQLEPVAALLPESALYQLEEFESRVDAALHKKVDIQEAL	-----KRPVVK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>O. sativa</i>	ELTPAA--RKKKQKLPKESQERVAALLPESALYQLEEFESRVDAALHKKVDIQEAL	-----KRPVVK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>A. thaliana</i>	ELTPAA--RKKKQKLPKESQERVAALLPESALYQLEEFESRVDAALHKKVDIQEAL	-----KRPVVK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
<i>S. cerevisiae</i>	-----VPVYPTDAYIPTYLEP--DKVSNLADLKKLIEMDSRLDLYLTRRLDTSINLPNTKTKDHPFNK	-----KRPVVK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								
	-----VPHSHPSDMVIRHLELIPELYFQOQVDSSEKRLDHFHLRLHMKRMV-----AQWERSKLSQEFLYPHLNFNPKFLRIFISNTESPSK--AEG--SSAGT	-----KRPVVK-----	RKLRIYISNTENPAK--SDAESDGS								

Abb. 2-12 Gegenüberstellung der Sequenz der BAP60-DBD mit homologen Sequenzen verschiedener BAP60-Orthologe. Im Folgenden sind die dargestellten Sequenzen aufgelistet (von oben nach unten). *Homo sapiens*: BAF60b, BAF60c und BAF60a. *Drosophila melanogaster*: BAP60. *Anopheles gambiae*: ENSANGP00000021019 und ENSANGP00000020546. *Ciona intestinalis*: AK112677.1 (Identifikationsnummer der mRNA). *Caenorhabditis elegans*: NP_491329.2. *Oryza sativa*: CAD40740.2. *Arabidopsis thaliana*: AAL38282.1. *Saccharomyces cerevisiae*: RSC6 und SWP73. Alle Sequenzen wurden über die Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bezogen. Die Abgleichung der Sequenzpositionen erfolgte außer für die Hefe-Sequenzen mit Hilfe des Algorithmus Clustal W 1.81 (Abschnitt 3.5). Die Sequenzpositionen der Hefe-Proteine SWP73 und RSC6 wurden basierend auf PSI-BLAST-Ergebnissen (Abschnitt 3.5) gegen BAP60 abgeglichen und manuell in die allgemeine Gegenüberstellung eingearbeitet. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren entsprechen der Consensus-Aminosäure der jeweiligen Sequenzposition. Hellgrau unterlegte Aminosäuren besitzen in der BLOSUM62-Substitutionsmatrix (Henikoff und Henikoff, 1992) in Bezug auf die Consensus-Aminosäure dieser Sequenzposition einen positiven Wert. Sternchen markieren konservierte basische Aminosäuren, die für *In-vitro*- und *In-vivo*-Analysen zu Alanin mutiert wurden (BAP60^{K158A}, BAP60^{K166A}, BAP60^{R185A}).

Die Sequenz dieser Domäne und die Gegenüberstellung mit gleichen Sequenzbereichen von BAP60-Homologen anderer Organismen ist in Abb. 2-12 gezeigt. Die Gegenüberstellung dieser Sequenzen weist auf einige Positionen innerhalb der DBD hin, an denen sich konservierte basische Aminosäuren befinden. Gleichzeitig ist im Anfangsbereich der Domäne aller Organismen außer der Hefe eine Aneinanderreihung mehrerer Lysine zu erkennen.

Um sicherzugehen, dass die beobachtete DNA-Bindung nicht allein durch den basischen Charakter der fünf Lysine bewirkt wird, die sich in der BAP60-DBD an dieser Stelle befinden, wurden drei der basischen, konservierten Aminosäuren, die an anderer Stelle in der DBD liegen, durch ortsgerichtete Mutagenese in Alanin umgewandelt (Abschnitt 3.3.3). Es wurde angenommen, dass diese basischen Aminosäuren an einer Bindung der Domäne an das saure Phosphat-Rückgrat der DNA beteiligt sein könnten und dies den Grund für ihre Konservierung darstellt.

Volllängen-BAP60, das mindestens an einer dieser drei Stellen die Mutation zum Alanin trägt, zeigt eine klar verringerte Fähigkeit zur DNA-Bindung (BAP60^{K158A}, BAP60^{K166A} und BAP60^{R185A}; Abb. 2-13). Damit wurde auch gezeigt, dass die DNA-Bindungsaktivität von BAP60 tatsächlich auf den Sequenzbereich der DBD zurückgeht.

Da BAP60 kein bekanntes DNA-bindendes Sequenzmotiv enthält, wurde als nächstes untersucht, ob umgekehrt die DBD selbst ein bislang unbekanntes Motiv darstellt, das sich auch in anderen Proteinen findet. Hierzu wurde mit der Sequenz der BAP60-DBD als Ausgangspunkt eine PSI-BLAST-Analyse (Abschnitt 3.5) durchgeführt. Doch auch nach drei Iterationen des Suchalgorithmus fanden sich keine Proteinsequenzen außerhalb der Familie der BAP60-Homologe, die eine signifikante Ähnlichkeit zur BAP60-DBD aufweisen (E-Wert < 0,05). Andererseits tauchten alle bekannten Homologe von BAP60 in der Ergebnisliste der PSI-BLAST-Analyse auf, selbst die vergleichsweise divergenten Hefe-Proteine (vergleiche Abb. 2-12). Somit ist die identifizierte DBD auf die Familie der BAP60-Homologe beschränkt, in dieser selbst jedoch konserviert.

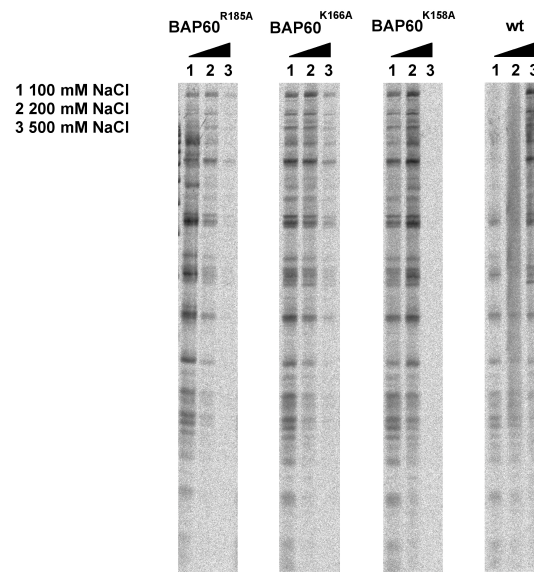


Abb. 2-13 Auswirkung der Mutation konservierter basischer Aminosäuren innerhalb der BAP60-DBD auf die DNA-Bindungsaktivität des Volllängen-Proteins. Drei konservierte basische Aminosäuren innerhalb der DNA-Bindungsdomäne von BAP60 wurden unabhängig voneinander zu Alanin mutiert und die so veränderten Volllängen-Proteine anschließend in einer DNA-Co-Immunopräzipitation auf ihre Fähigkeit zur DNA-Bindung hin untersucht. Alle drei Mutationen führen zu einer starken Verringerung der DNA-Retention. Statt wie das Wildtyp-Protein DNA-Fragmente bis zu einer NaCl-Konzentration von 500 mM halten zu können, wird der Großteil der DNA bei den mutierten Proteinformen bereits mit dem Bindungspuffer eluiert.

2.5.3 Überprüfung sequenzabhängiger DNA-Bindung durch die BAP60-DBD

Untersuchungen zu den DNA-Bindungseigenschaften des SWI/SNF-Komplexes der Hefe hatten keine sequenzabhängige Bindung des Komplexes an Promotor-DNA ergeben (Quinn *et al.*, 1996). Die Identifizierung einer DNA-bindenden Domäne in BAP60 warf jedoch die Frage auf, ob diese Domäne für sich allein vielleicht sequenzspezifisch bindet. Um ein mögliches DNA-Sequenzmotiv zu identifizieren, das von der BAP60-DBD bevorzugt gebunden wird, wurde eine SELEX-Analyse durchgeführt (*selective evolution of ligands by exponential enrichment*; Jun und Desplan, 1996; Abb. 2-14; Abschnitt 3.4.5).

Hierbei wird eine Bibliothek doppelsträngiger DNA-Moleküle, die eine vollständig randomisierte Kernsequenz von ca. 20 bp aufweisen, im 10-fachen Überschuss mit dem Zielprotein inkubiert. Nichtgebundene DNA wird anschließend durch Waschen

entfernt und gebundene DNA durch eine PCR amplifiziert. Letzteres ist aufgrund von konstanten Endsequenzen innerhalb der verwendeten DNA-Moleküle möglich, gegen welche die Primer der PCR gerichtet sind. Die so angereicherte DNA wird anschließend erneut mit dem Zielprotein inkubiert und gebundene DNA wiederum in einer PCR amplifiziert. Der beschriebene Prozess wird über mehrere Runden wiederholt, bis schließlich die amplifizierte DNA kloniert und durch Sequenzierung ausgewertet wird. Im Falle eines sequenzspezifisch bindenden Proteins sollte beim Vergleich der klonierten Sequenzen ein gemeinsames Motiv bereits offensichtlich sein (siehe Jun und Desplan, 1996).

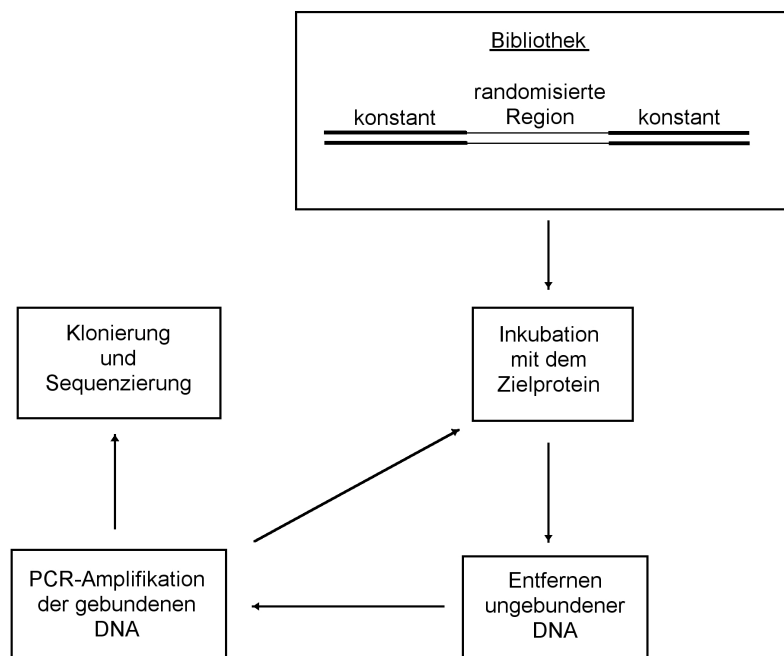


Abb. 2-14 Schematische Darstellung des Ablaufs eines SELEX-Experiments zur Identifizierung von Zielsequenzen DNA-bindender Proteine. Doppelsträngige DNA-Moleküle mit einer vollständig randomisierten Kernsequenz von ca. 20 bp werden mit einem Zielprotein inkubiert, das an einer Matrix immobilisiert wurde. Nichtgebundene DNA wird anschließend durch Waschen entfernt und gebundene DNA durch eine PCR amplifiziert. Als Primer in der PCR dienen Oligonukleotide, die gegen die konstanten Endbereiche der verwendeten DNA-Moleküle gerichtet sind. Die angereicherte DNA wird anschließend erneut mit dem Zielprotein inkubiert und gebundene DNA wiederum in einer PCR amplifiziert. Nachdem der Prozess über mehrere Runden wiederholt wurde, wird die amplifizierte DNA schließlich kloniert und nach einer Sequenzierung ausgewertet.

Ein gemeinsames Sequenzmotiv war bei der BAP60-DBD nach Auswertung von Sequenzen nach der fünften und nach der siebten Runde nicht erkennbar. Zusätzlich ergab sich das Problem, dass mit zunehmender Rundenzahl in der PCR ein Produkt dominierte, welches nur die endständigen Primersequenzen enthielt. Deswegen musste bereits nach der siebten Runde diejenige PCR-Bande gesondert aus dem Agarose-Gel extrahiert und kloniert werden, welche das vollständige Produkt darstellte. Die Sequenzen der neunten Runde waren schließlich überhaupt nicht mehr auswertbar. Das Ergebnis der SELEX deutete somit bereits darauf hin, dass die BAP60-DBD keine sequenzspezifische DNA-Bindung zeigt. Die endständigen Primer-Sequenzen würden in einem solchen Fall für eine Bindung an das Protein bereits ausreichen und DNA-Moleküle, die nur aus diesen Sequenzen bestehen und keine Kernsequenz enthalten, hätten in der PCR aufgrund ihrer geringeren Länge einen Vorteil gehabt.

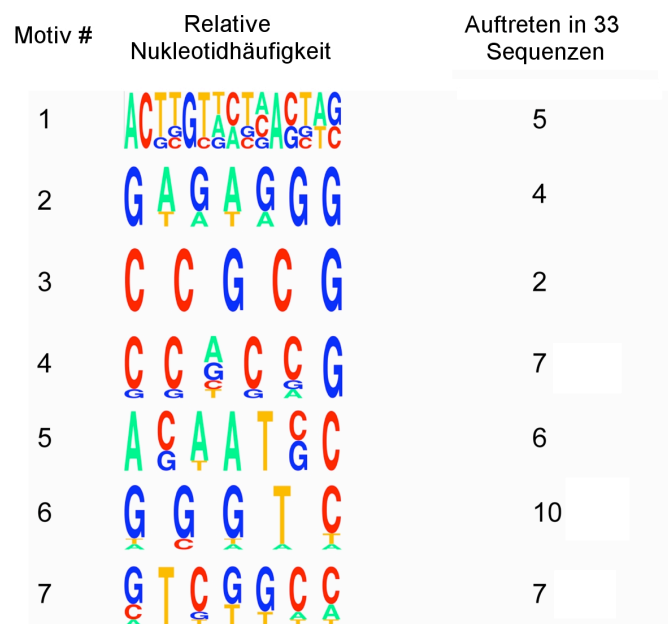


Abb. 2-15 Graphische Darstellung der mittels MEME und Patser in den SELEX-Sequenzen identifizierten potenziellen Motive. 32 Sequenzen aus der fünften und siebten Runde der SELEX dienten als Grundlage für eine Motivsuche mit Hilfe des MEME-Algorithmus. Die so identifizierten potenziellen Motive dienten wiederum als Grundlage um mit dem Patser-Algorithmus noch einmal alle Sequenzen zu durchsuchen. Dabei wurden weitere Sequenzen gefunden, die von MEME selbst den potenziellen Motiven nicht zugeordnet worden waren. Mit Hilfe eines speziellen Programms (<http://genes.mit.edu/pictogram.html>) wurde schließlich die hier abgebildete graphische Darstellung der relativen Nukleotidhäufigkeiten erstellt.

Es wurde zusätzlich überprüft, ob die gewonnenen DNA-Sequenzen ein vielleicht weniger offensichtliches Motiv enthalten. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen zuerst einer Analyse mit dem MEME-Algorithmus unterzogen (Abschnitt 3.5). Dies ergab insgesamt sieben potenzielle Motive. Um weitere Sequenzen zu identifizieren, in denen die MEME-Motive vorkommen, welche von MEME selbst aufgrund seiner konservativen Kriterien jedoch nicht berücksichtigt wurden, wurde zusätzlich der Patser-Algorithmus (Abschnitt 3.5) verwendet. Mit Hilfe der so den Motiven zugeordneten Sequenzen wurden die in Abb. 2-15 dargestellten Piktogramme erstellt. Sie dienten als Grundlage für den Entwurf von Oligonukleotiden, mit deren Hilfe die Bindung der BAP60-DBD an die verschiedenen Motive in EMSA-Versuchen überprüft werden sollte (*electromobility shift assay*; Abschnitt 3.4.6).

Die EMSA-Methode basiert auf der unterschiedlichen Beweglichkeit von freier, ungebundener DNA und Protein-gebundener DNA im Polyacrylamid-Gel. Dabei wird die DNA durch radioaktive Markierung sichtbar gemacht. Die EMSA-Versuche zeigten, dass die freie BAP60-DBD alle sieben Motive gleichermaßen bindet (Abb. 2-16), obgleich diese Motive sich grundsätzlich voneinander unterscheiden. Dies wies wiederum auf eine sequenzunspezifische Bindung hin. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz eines hohen molaren Überschusses des GST-Fusionsproteins der BAP60-DBD eine Verschiebung der DNA bis in den Bereich der Geltaschen erreicht werden (Abb. 2-17). Der Grund hierfür lässt sich in der Dimerisierung der GST finden (Ji *et al.*, 1992), die zusammen mit der Fähigkeit der DBD, unspezifisch an mehr als einen Bereich der DNA-Moleküle zu binden, zu einer Quervernetzung von DNA und Proteinen führt. Es entsteht somit ein Agglomerat, das nicht mehr in der Lage ist, in das Gel einzudringen. Der Einsatz eines geringeren Überschusses des GST-Fusionsproteins (300 nM Protein und 10 nM DNA) dagegen führt zu einem stark verschmierten DNA-Signal im Gel (ohne Abbildung), was mit der Bildung unterschiedlich großer Agglomerate erklärt werden kann. Insgesamt deuten alle Ergebnisse somit auf eine sequenzunabhängige DNA-Bindung der BAP60-DBD hin.

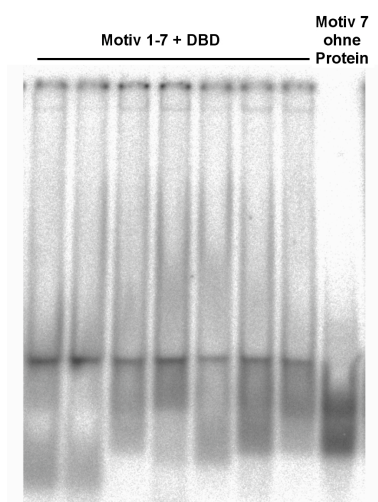


Abb. 2-16 Ergebnis eines EMSA-Experiments zur Überprüfung der mittels MEME-Algorithmus identifizierten potenziellen Motive. Diejenigen in der SELEX identifizierten Sequenzen, welche laut Patser-Algorithmus die größte Ähnlichkeit mit den potenziellen Motiven aufwiesen, wurden radioaktiv markiert, mit der freien DNA-Bindungsdomäne von BAP60 inkubiert und anschließend auf ein 10%-Polyacrylamid-Gel geladen. In allen Fällen kommt es in Anwesenheit der BAP60-DBD zu einer Verschiebung des DNA-Signals. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Motive ist daher von keiner sequenzspezifischen Bindung durch die DBD auszugehen. Eingesetzte DNA-Konzentration: 1 nM. Eingesetzte Protein-Konzentration: 300 nM.



Abb. 2-17 Ergebnis eines EMSA-Experiments zur Überprüfung der mittels MEME-Algorithmus identifizierten potenziellen Motive. Das GST-Fusionsprotein der BAP60-DBD wurde im hohen molaren Überschuss mit der markierten DNA des Motivs 7 inkubiert und auf ein 5%-Polyacrylamid-Gel geladen. Es zeigte sich eine Verschiebung des DNA-Signals in den Bereich der Geltaschen hinein. Der Grund liegt wahrscheinlich in einer Quervernetzung der DNA-Moleküle, hervorgerufen durch die Dimerisierung der GST und der Fähigkeit der BAP60-DBD, die DNA-Moleküle an mehr als nur einer Stelle zu binden. Eingesetzte DNA-Konzentration: 1 nM. Eingesetzte Protein-Konzentration: 1 μ M.

2.5.4 Bindung der BAP60-DBD an polytänen Chromosomen *in vivo*

Bis zu diesem Punkt ist nur die Fähigkeit der BAP60-DBD zur DNA-Bindung *in vitro* gezeigt worden. Um herauszufinden, ob diese Bindungsaktivität auch *in vivo* von Relevanz sein kann, wurde als nächstes die Möglichkeit einer Assoziation der BAP60-DBD mit chromosomalen Strukturen *in vivo* untersucht. Dazu wurde ein Fusionsprotein der BAP60-DBD und des grün fluoreszierenden Proteins GFP hergestellt. Das Protein trug zusätzlich am N-Terminus das Kernlokalisierungssignal des *large T-antigen* (Kalderon *et al.*, 1984). Das Gen für dieses Fusionsprotein wurde in den Vektor *pUAST* einkloniert und als Transgen in die Fliege eingebracht (Abschnitt 3.1.2). Die Einklonierung in den *pUAST*-Vektor ermöglicht die Nutzung des *UAS-Gal4*-Systems (Brand und Perrimon, 1993), das über Einkreuzung eines *Gal4*-exprimierenden Transgens zu einer gewebspezifischen Expression des *UAS*-kontrollierten Gens genutzt werden kann.

Im Falle des Fusionsproteins von BAP60-DBD und GFP (DBD-GFP) wurde eine Expression in den Speicheldrüsen später Larven angestrebt. Diese Speicheldrüsen sind leicht zu präparieren und enthalten polytäne Chromosomen, die lichtmikroskopisch gut zu untersuchen sind. Um das Fusionsprotein wie gewünscht in den Speicheldrüsen zu exprimieren, wurde die Treiberlinie *Sgs3-Gal4* verwendet (Cherbas *et al.*, 2003), welche den Transkriptionsfaktor GAL4 spezifisch in den Speicheldrüsen exprimiert. Zur Kontrolle wurde eine Variante von GFP, die ebenfalls mit dem Kernlokalisierungssignal des *large T-antigen* versehen war, für sich allein in den Speicheldrüsen exprimiert. Die Expression der Proteine in den Kernen der Speicheldrüsen konnte *in situ* über die Fluoreszenz des GFP überprüft werden.

Nach der Präparation von unfixierten Kernen aus fluoreszierenden Speicheldrüsen (Abschnitt 3.2.6) zeigte sich bereits, dass die polytänen Chromosomen im Falle der DBD-GFP-exprimierenden Larven deutlich grün fluoreszierten, während isolierte Kerne aus Larven, die das reine GFP exprimierten, keine Fluoreszenz zeigten (ohne Abbildung). Im letzteren Falle war das GFP somit während der Präparation aus den Kernen herausgewaschen worden. Um ein genaueres Bild von der Bindung der BAP60-DBD an die Chromosomen zu erhalten, wurde als nächstes eine Antikörperfärbung an fixierten, gespreiteten Chromosomen durchgeführt (Abschnitt 3.2.7 und 3.2.8). Hierzu wurde ein gegen GFP gerichteter Antikörper verwendet. Im

Fälle der GFP-exprimierenden Speicheldrüsen ergab sich wiederum kein Signal. Im Falle der DBD-GFP-exprimierenden Speicheldrüsen dagegen zeigte sich eine deutliche Färbung der Chromosomen inklusive eines Bandenmusters (Abb. 2-18A). Das Bandenmuster verlief entlang der gesamten Länge der Chromosomen und koinzidierte mit einem Bandenmuster, welches bei gleichzeitiger Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 entsteht (Abb. 2-18B, C). Daraus läßt sich eine Korrelation von DBD-Lokalisierung und DNA-Gehalt herleiten. Obwohl das Ergebnis eine Bindung an chromosomale Proteine nicht ausschließt, erschien mit Hinblick auf die beobachtete DNA-Bindung *in vitro* eine DNA-Bindung *in vivo* somit wahrscheinlich. Das Bandenmuster kann dagegen nicht durch Assoziation der Domäne mit dem endogenen Brahma-Komplex zustande gekommen sein, da BRM nicht mit Banden hohen DNA-Gehaltes kolokalisiert (Armstrong *et al.*, 2002).

2.5.5 Auswirkung mutierter Formen der BAP60-DBD auf die Funktion *in vivo*

In Abschnitt 2.5.2 wurde die Erzeugung mutierter Formen von BAP60 beschrieben, die eine starke Beeinträchtigung der DNA-Bindung *in vitro* zeigten. Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit der DNA-Bindungsdomäne zur Assoziation mit chromosomaler DNA *in vivo* durch diese Mutationen ebenso beeinträchtigt ist, wurden wiederum Immunfärbungen an polytären Chromosomen durchgeführt. Es wurde vorgegangen wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben. Der einzige Unterschied bestand darin, dass Formen der BAP60-DBD untersucht wurden, die an den gleichen Stellen Mutationen zu Alanin trugen wie die zuvor beschriebenen Volllängen-Proteine BAP60^{K158A} und BAP60^{R185A} (siehe Abschnitt 2.5.2). Es stellte sich heraus, dass diese mutierten Formen der BAP60-DBD die gleiche Fähigkeit zur Assoziation mit chromosomalen Strukturen haben wie für die Wildtyp-Form im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Wiederum zeigten sich Bandenmuster, die deckungsgleich mit dem Muster waren, das sich durch Färbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 ergibt (ohne Abbildung). Somit stellte sich die Frage, ob diese Mutationen überhaupt eine Auswirkung auf die Funktion des Proteins *in vivo* haben.

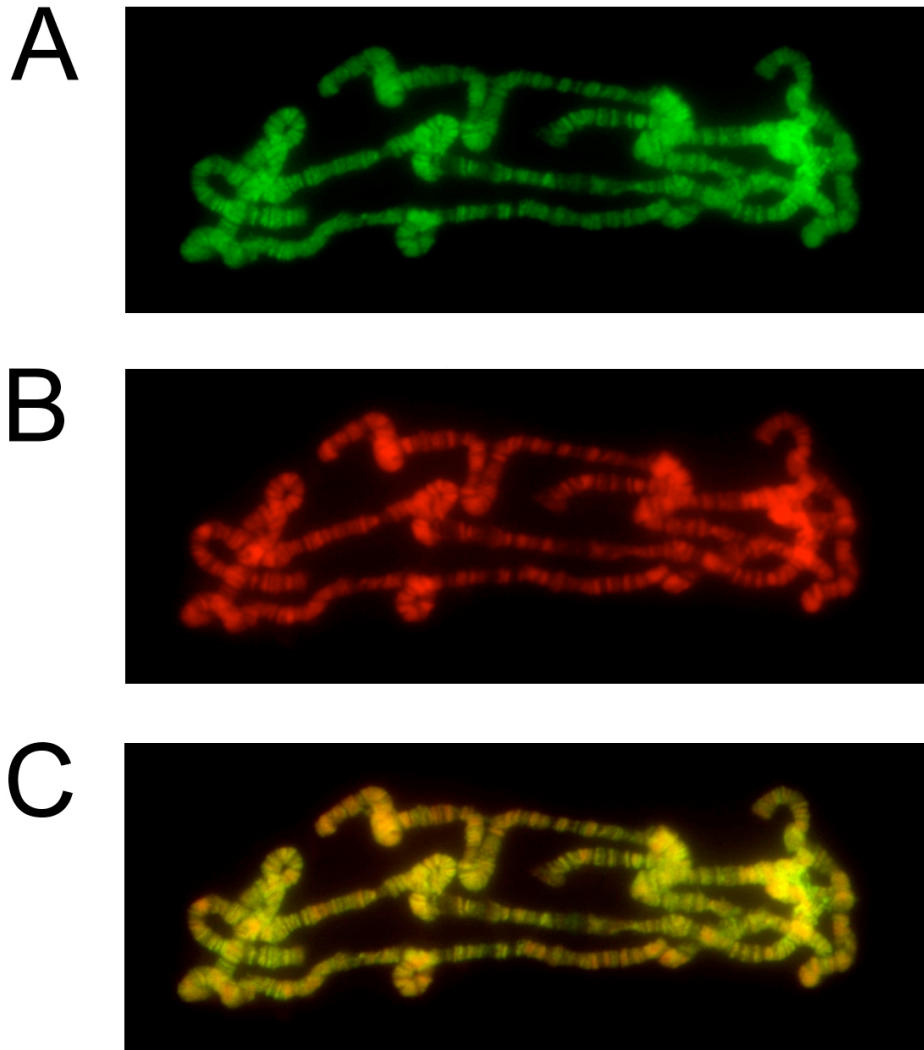


Abb. 2-18 Antikörperfärbung an polytären Chromosomen aus Speicheldrüsen, die ein Fusionsprotein der BAP60-DBD und GFP exprimieren. Die BAP60-DBD wurde mit einem Kernlokalisierungssignal versehen, mit GFP fusioniert und in den Speicheldrüsen später Larven exprimiert. Polytäre Chromosomen dieser Speicheldrüsen wurden fixiert, gespreitet und einer Antikörperfärbung gegen GFP unterzogen. Als sekundärer Antikörper diente ein Alexa 488-konjugierter Antikörper. (A) Die Immunofärbung gegen GFP (grün) zeigt eine Lokalisierung der BAP60-DBD in Form eines Bandenmusters entlang der gesamten Länge der Chromosomen. (B) Gegenfärbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (rot). (C) Überlagerung von A und B. Das Bandenmuster der DBD-Lokalisierung korreliert mit dem der DNA-Färbung. Eine allgemeine Fähigkeit zur DNA-Bindung durch die BAP60-DBD scheint somit auch *in vivo* gegeben.

Das Vorhandensein der *Bap60^l*-Mutante ermöglichte es, dies zu überprüfen. Die mutierten Gene *Bap60^{K158A}* und *Bap60^{R185A}* wurden wie in Abschnitt 2.2.3 für das Wildtyp-Gen beschrieben unter die Kontrolle des *ac5*-Promotors gestellt und als Transgene in die Fliegen gebracht. Anschließend wurde untersucht, ob diese mutierten Formen wie die Wildtyp-Variante in der Lage sind, den Letalitäts-Phänotyp von *Bap60^l* zu revertieren (vergleiche Abb. 2-5). Tatsächlich war dies der Fall: drei von neun *Bap60^{K158A}*-Transgenen und zwei von zwölf *Bap60^{R185A}*-Transgenen vermochten es, die Letalität von *Bap60^l* zu unterdrücken. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass sich die tatsächlichen *In-vivo*-Zielstrukturen der DNA-Bindungsdomäne von BAP60 von der freien, linearen DNA, wie sie im *In-vitro*-Versuch verwendet wurde, unterscheiden und dass die im *In-vitro*-Versuch beobachtete DNA-Bindung somit nicht von primärer biologischer Bedeutung ist. Stattdessen könnte die DNA-Bindung *in vivo* durch zusätzliche Kontaktpunkte stabilisiert sein, die von speziellen Strukturen der DNA innerhalb des Chromatins abhängen. Alternativ könnte die DNA-Bindung im Chromatin-Kontext durch zusätzliche Interaktionen der Domäne mit Protein-Komponenten des Chromatins komplementiert werden.

2.6 Untersuchungen zur Beteiligung von BAP60 an der Geschlechtsfestlegung

Unabhängig von den bisher beschriebenen Untersuchungen wurde im Labor von J. W. Erickson (Texas A&M University, College Station, Texas, USA) nach genetischen Interaktionspartnern der Numerator-Elemente *sisA* und *sc* gesucht. Dabei wurden zwei chromosomale Defizienzen identifiziert, die in der Kombination mit zygotischen *sisA*- und *sc*-Allelen dominante Maternaleffekte bewirkten. Weibliche Embryonen, die heterozygot für diese *sisA*- und *sc*-Allele waren und deren Mütter eine der Defizienzen trugen, zeigten eine erhöhte Letalitätsrate. Innerhalb des Überlappungsbereichs dieser beiden Defizienzen, *Df(1)JA26* und *Df(1)N12*, liegt der Locus des *Bap60*-Gens. Da es als wahrscheinlich zu erachten ist, dass die beobachtete Letalität ihre Ursache in einer fehlerhaften Aktivierung des *Sex-lethal*-Gens oder in Fehlern nachgeschalteter Regulationsprozesse hat, galt *Bap60* als Transkriptionsfaktor *sensu latu* als ein möglicher Kandidat unter den Genen innerhalb des

Überlappungsbereichs, der für den *sisA*- und *sc*-abhängigen Letalitätseffekt verantwortlich sein könnte.

2.6.1 Prüfung einer genetischen Interaktion zwischen *Bap60* und den Numerator-Elementen *sisA* und *sc*

In Zusammenarbeit mit J. W. Erickson wurde untersucht, ob der partielle maternale Verlust von *Bap60* ausreicht, um in Kombination mit zygotischen *sisA*- bzw. *sc*-Allelen eine erhöhte Letalitätsrate weiblicher Embryonen zu bewirken. Die Tabellen 2-5 und 2-6 zeigen die Ergebnisse dieser genetischen Versuche. Unter normalen Umständen ist ein Geschlechterverhältnis von 1:1 zu erwarten. Die Anzahl männlicher Fliegen wurde daher gleich 100% gesetzt und diente als Grundlage für die Berechnung der weiblichen Prozentwerte. Im Normalfall sollten die weiblichen Fliegen ebenfalls 100% erreichen. Die Kreuzungsversuche #1, 2 und 4 in Tabelle 2-5 zeigen, dass maternale Heterozygotie für *Bap60*^l in Kombination mit zygotischer Heterozygotie für *sisA*^l in verschiedenen genetischen Hintergründen zu einer stark verringerten Anzahl weiblicher Fliegen führt (der Prozentwert weiblicher Fliegen ist deutlich kleiner als die erwarteten 100%). Die Kreuzungsversuche #3 und 5 in Tabelle 2-5 zeigen, dass das *sisA*^l-Allel allein keinen solchen Effekt hat. Ferner zeigt die Aufschlüsselung der weiblichen Genotypen in Kreuzungsversuch #1, dass die erhöhte Letalität weiblicher Fliegen nicht von zygotischem *Bap60*-Ausfall abhängt und daher allein der maternale Genotyp entscheidend ist. Aus der Unterdrückung der genetischen Interaktion durch Einkreuzung eines *act-Bap60*-Transgens in Kreuzungsversuch #6 (Tabelle 2-5) geht schließlich hervor, dass die genetische Interaktion tatsächlich auf das *Bap60*^l-Allel zurückzuführen ist, und nicht etwa auf den genetischen Hintergrund des *Bap60*^l-Chromosoms. Die Kreuzungsversuche #7, 8 und 9 in Tabelle 2-6 zeigen äquivalente Sachverhalte für zwei verschiedene *sc*-Allele. Die Beschränkung der Effekte auf weibliche Fliegen und die Identität von *sisA* und *sc* als Numerator-Elemente der Geschlechtsfestlegung zeigen, dass *Bap60* an denjenigen Prozessen beteiligt ist, welche über Aktivierung des frühen *Sex-lethal*-Promotors in weiblichen Embryonen zur Unterdrückung der Dosiskompensation führen. Die Kombination einer verringerten BAP60-Konzentration mit einem teilweisen Ausfall

Tabelle 2-5 Auswirkung maternalen Heterozygotie für *Bap60^l* auf das Überleben weiblicher Embryonen, die heterozygot für ein *sisA*-Allel sind.

	Kreuzungsansatz (Parentalgeneration)	Genotyp/Geschlecht (Filialgeneration)	Anzahl adulter Fliegen	Prozentsatz [§]
#1	<i>Bap60^l / FM7c</i> X <i>y v sisA^l B os^{sisCl}</i>	weiblich <i>Bap60^l / y v sisA^l B os^{sisCl}</i> <i>FM7c / y v sisA^l B os^{sisCl}</i>	64 52	12% 10%
		männlich <i>FM7c</i>	269	100%*
#2	<i>Bap60^l / w¹¹¹⁸</i> X <i>y v sisA^l B os^{sisCl}</i>	weiblich	87	44%
		männlich	99	100%*
#3	<i>FM7c / w¹¹¹⁸</i> X <i>y v sisA^l B os^{sisCl}</i>	weiblich <i>FM7c / y v sisA^l B os^{sisCl}</i> <i>w¹¹¹⁸ / y v sisA^l B os^{sisCl}</i>	80 86	47% 51%
		männlich	170	100%
#4	<i>Bap60^l / w¹¹¹⁸</i> X <i>y cm ct sisA^l</i>	weiblich	57	52%
		männlich	55	100%*
#5	<i>FM7c / w¹¹¹⁸</i> X <i>y cm ct sisA^l</i>	weiblich <i>FM7c / y cm ct sisA^l</i> <i>w¹¹¹⁸ / y cm ct sisA^l</i>	68 64	54% 51%
		männlich	126	100%
#6	<i>Bap60^l / Bap60^l; act-Bap60 / act-Bap60</i> X <i>y v sisA^l B os^{sisCl}</i>	weiblich	55	96%
		männlich	57	100%

[§] Die Anzahl männlicher Fliegen wurde gleich 100% gesetzt. Im Normalfall sollten die weiblichen Fliegen ebenfalls 100% erreichen.

* Männliche Fliegen, die das *Bap60^l*-Chromosom tragen, überleben nicht. Die Anzahl ausgezählter männlicher Fliegen wurde daher zur Festlegung des 100%-Wertes verdoppelt.

Tabelle 2-6 Auswirkung maternaler Heterozygotie für *Bap60^l* auf das Überleben weiblicher Embryonen, die heterozygot für verschiedene *sc*-Allele sind.

	Kreuzungsansatz (Parentalgeneration)	Genotyp/Geschlecht (Filialgeneration)	Anzahl adulter Fliegen	Prozentsatz [§]
#7	<i>Bap60^l / w¹¹¹⁸</i> X <i>y Df(1)sc19, sisB pn w / y⁺Y-</i> <i>Dp(1;Y)ASC</i>	weiblich	295	52%
		männlich	283	100%*
#8	<i>FM7c / w¹¹¹⁸</i> X <i>y Df(1)sc19, sisB pn w / y⁺Y-</i> <i>Dp(1;Y)ASC⁺</i>	weiblich	166	82%
		männlich		
		<i>w¹¹¹⁸</i>	101	100% [§]
#9	<i>Bap60^l / w¹¹¹⁸</i> X <i>In(1)sc¹⁰⁻¹/y⁺Y-Dp(1;Y)ASC⁺</i>	weiblich	75	61%
		männlich	61	100%*

[§] Die Anzahl männlicher Fliegen wurde gleich 100% gesetzt. Im Normalfall sollten die weiblichen Fliegen ebenfalls 100% erreichen.

* Männliche Fliegen, die das *Bap60^l*-Chromosom tragen, überleben nicht. Die Anzahl ausgezählter männlicher Fliegen wurde daher zur Festlegung des 100%-Wertes verdoppelt.

[§] Die männlichen *FM7c*-Fliegen wurden nicht ausgezählt. Daher wurde die Anzahl der männlichen *w*-Fliegen zur Festlegung des 100%-Wertes verdoppelt.

von SISA oder SC führt demnach in weiblichen Embryonen zu einer fehlerhaften Unterdrückung der Dosiskompensation, wodurch die X-chromosomale Transkriptionsrate ein letales Maß erreicht.

Die genetischen Interaktionsdaten lassen keine Aussage darüber zu, auf welcher Ebene BAP60 an diesen Prozessen beteiligt ist. So könnte BAP60 bei der transkriptionellen Aktivierung der *sisA*- und *sc*-Gene, bei der Aktivierung des frühen *Sxl*-Promotors oder bei der Unterdrückung der X-chromosomalen Transkription durch SXL eine Rolle spielen.

2.6.2 Bindung von BAP60 an SISA und SC *in vitro*

Eine der möglichen Erklärungen zur Beteiligung von BAP60 an der Geschlechtsfestlegung und der Unterdrückung der Dosiskompensation in weiblichen Embryonen ist, dass BAP60 eine Rolle in der Aktivierung des frühen *Sxl*-Promotors spielt. So könnte die genetische Interaktion zwischen *Bap60* und *sisA* bzw. *sc* auf einer Rekrutierung des Brahma-Komplexes an diesen Promotor beruhen. Der starke Effekt eines partiellen Ausfalls von BAP60 würde sich dann durch eine Abhängigkeit des Rekrutierungsprozesses von der Anwesenheit der BAP60-Untereinheit erklären lassen. Als rekrutierende Transkriptionsfaktoren kämen dabei SISA und SC in Frage. Um festzustellen, ob BAP60 zu einer direkten Interaktion mit diesen Proteinen in der Lage ist, wurde ein *In-vitro*-Bindungsversuch mit bakteriell exprimiertem GST-BAP60-Fusionsprotein und *in vitro* translatierten SISA- bzw. SC-Proteinen durchgeführt (Abschnitt 3.4.7). Das Fusionsprotein war dabei an einer Agarose-Matrix immobilisiert. Nach Zugabe des jeweiligen *in vitro* translatierten Proteins wurde mit detergenten- und salzhaltigem Puffer gewaschen, die Proteine anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und zurückgehaltenes *in vitro* translatiertes Protein autoradiographisch sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 2-19 zu sehen binden sowohl SISA als auch SC an das GST-BAP60-Fusionsprotein, jedoch nicht an die GST allein. Ferner ist für den als Kontrolle eingesetzten Transkriptionsfaktor MAD (Kim *et al.*, 1997) keine Wechselwirkung mit GST-BAP60 zu konstatieren. Dies spricht für die Spezifität der Interaktion zwischen BAP60 und SISA bzw. SC. Die Fähigkeit von BAP60 zur direkten Wechselwirkung mit diesen Proteinen deutet darauf hin, dass die Einbindung von BAP60 in den Prozess der Geschlechtsfestlegung tatsächlich auf einer Rolle von BAP60 in der Rekrutierung des Brahma-Komplexes an den frühen *Sxl*-Promotor beruht.

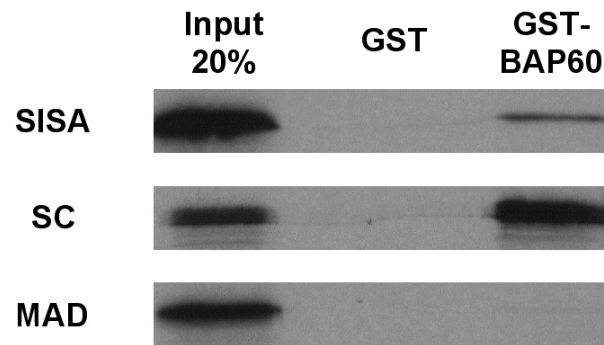


Abb. 2-19 *In-vitro*-Bindungsversuch mit bakteriell exprimiertem GST-BAP60-Fusionsprotein und den *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Transkriptionsfaktoren SISA, SC und MAD. Das Fusionsprotein bzw. GST wurden an einer Agarose-Matrix immobilisiert und mit dem jeweiligen *in vitro* translatierten Protein versetzt. Nach ausgiebigem Waschen mit detergenten- und salzhaltigem Puffer wurden die Proteine aufgetrennt und zurückgehaltenes *in vitro* translatiertes Protein schließlich autoradiographisch sichtbar gemacht. Sowohl SISA wie auch SC zeigen eine Fähigkeit zur Bindung an GST-BAP60, jedoch nicht an GST allein. Darüber hinaus ist keine Bindung des Transkriptionsfaktors MAD an GST-BAP60 festzustellen, was für die Spezifität der Interaktion zwischen BAP60 und SISA bzw. SC spricht.

3. Material und Methoden

Alle aufgeführten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe) oder Biomol (Hamburg) bezogen.

3.1 Genetik

3.1.1 Fliegenstämme

Zur Haltung und Kreuzung der Fliegenstämme wurden Standardbedingungen und -methoden angewandt (Ashburner, 1989; Roberts, 1986; Greenspan, 1997). Tabelle 3-1 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme (siehe nächste Seite). Die Bezugsquelle „Bloomington“ bezieht sich auf die *Drosophila* Stammsammlung der Indiana University in Bloomington, Indiana (USA). Die aufgeführten Allele und Chromosomen sind in Lindsley und Zimm (1992) sowie auf der FlyBase-Webseite (<http://flybase.bio.indiana.edu>) näher beschrieben.

3.1.2 Erzeugung transgener Fliegen

Für die Herstellung transgener Fliegen wurde das jeweilige P-Element-basierte Konstrukt (Abschnitt 3.3.6) zuerst mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits (Qiagen, Hilden) aus Bakterien isoliert, anschließend dann Phenol/Chloroform-extrahiert und Ethanol-gefällt. Das Konstrukt wurde in einem Mengenverhältnis von 3:1 mit dem Transposase-codierenden $\Delta 2$ -3-Helferplasmid (Laski *et al.*, 1986) vermischt, erneut gefällt und in Injektionspuffer (0,1 mM Natriumphosphat-Puffer, 5 mM KCl, pH 6,8-7,8) aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde schließlich durch Verdünnung mit Injektionspuffer auf 450 ng/ μ l gebracht. Die so erhaltene Lösung wurde von Ursula Jahns-Meyer und Iris Plischke (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) in Präblastoderm-Embryonen eines *white*-Stammes injiziert. Es folgte eine Rückkreuzung der aus diesen Embryonen hervorgegangenen adulten Fliegen mit Fliegen eines *white*-Stammes. In der Nachkommenschaft konnten nun

3. Material und Methoden

transgene Fliegen aufgrund der roten Augenfarbe identifiziert werden, die sich aufgrund des *white*-Markergens des P-Element-Vektors ergibt. Die transgenen Fliegen wurden schließlich einzeln zur Etablierung von Stämmen erneut gegen *white*-Fliegen gekreuzt.

Tabelle 3-1 Übersicht der verwendeten Fliegenstämme.

Stammbezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle/ Referenz
<i>OreR</i>	Wildtyp-Stamm	Bloomington
<i>w</i>	<i>w</i>	Bloomington
<i>G1131</i>	<i>y w P[y⁺]G1131</i>	U. Schäfer*
<i>arm/FM7c</i>	<i>Y arm^{XK}/FM7c, w^a sn^{X2} v^{Of} g⁴</i>	Bloomington
<i>FM6</i>	<i>FM6 y^l w^l dm⁺ B/Dp(1;Y) y⁺</i>	Bloomington
<i>FM7i, act-GFP</i>	<i>C(1)DX, y f/FM7, y^{93j} sc⁸ w oc ptg B P[w^{+mC} act::GFP]/Y</i>	Reichhart und Ferrandon, 1998
<i>FM6;; Δ2-3, Sb/Δ2-3, Ubx</i>	<i>FM6 y w dm⁺ B/Dp(1;Y)y⁺; TM2, ry^l P[ry^{+17.2} Δ2-3]99B; MKRS, Sb P[ry^{+17.2} Δ2-3]99B</i>	U. Schäfer*
<i>brm²</i>	<i>brm² e^s ca^l/TM6B, Sb^l Tb^l ca^l</i>	Bloomington
<i>brm², trx^{E2}</i>	<i>brm² trx^{E2} ca^l/TM6B, Tb^l ca^l</i>	Bloomington
<i>trx^{E2}</i>	<i>ru^l h^l th^l st^l trx^{E2} ca^l/TM6B, Tb^l ca^l</i>	Bloomington
<i>mor^l</i>	<i>mor^l/TM6B, Tb^l</i>	Bloomington
<i>osa²</i>	<i>osa²/TM6B, Tb^l</i>	Bloomington
<i>snr1^{R3}</i>	<i>snr1^{R3}/TM6B</i>	Dingwall <i>et al.</i> , 1995
<i>Antp^{NS}</i>	<i>Antp^{NS}</i>	Bloomington
<i>Antp^{73b}</i>	<i>In(3R)Antp^{73b}, Antp^{73b} sas^{Antp73b} red^l e^l/TM3, Sb^l</i>	Bloomington
<i>FRT¹⁰¹</i>	<i>y^l w v²⁴ P[w^{+mW.hs}=FRT(w^{hs})]FRT¹⁰¹</i>	Bloomington
<i>ovo^{D1}, FRT¹⁰¹/C(1)DX/Y; FLP38</i>	<i>w ovo^{D1} v²⁴ P[w^{+mW.hs}=FRT(w^{hs})]FRT¹⁰¹/C(1)DX, y^l f^l/Y; P[ry^{+17.2}=hsFLP]38</i>	Bloomington
<i>In(1)w^{m4h}; Su(var)205⁵</i>	<i>In(1)w^{m4h}; Su(var)205⁵/In(2L)Cy, In(2R)Cy, Cy^l</i>	Bloomington
<i>sgs3-Gal4</i>	<i>w¹¹¹⁸; P{w^{+mC}=Sgs3-GAL4.PD}TP1</i>	Bloomington
<i>UAS-GFP.nls</i>	<i>w¹¹¹⁸; P{w^{+mC}=UAS-GFP.nls}8</i>	Bloomington

*U. Schäfer, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

3.1.3 Induktion von Keimbahnklonen

Zur Erzeugung homozygoter Keimbahnklone in heterozygoten Weibchen wurde das Flp/*FRT*-System der mitotischen Rekombination genutzt (Chou und Perrimon, 1992; Chou und Perrimon, 1996). Es wurden Kreuzungen von *Bap60^l*, *FRT¹⁰¹*-Weibchen mit *ovo^{DI}*, *FRT¹⁰¹/Y*; *Flp38*-Männchen angesetzt und diese Kreuzungsansätze täglich in ein neues Futterröhrchen überführt. Am zweiten und dritten Tag nach Beginn der Ablage wurden die Larven für jeweils eine Stunde in einem Wasserbad bei 38°C Wassertemperatur erhitzt und danach zur weiteren Entwicklung bei 25°C gehalten.

3.2 Embryologie

3.2.1 Eiablagen

Ablagen zur Gewinnung von Embryonen für die mRNA-Hybridisierung, die Antikörper-Färbungen, sowie für die Kutikula-Präparation und für die Bestimmung des Letalitätszeitpunktes erfolgten auf Apfelsaft-Agarplatten bei zusätzlicher Fütterung mit Hefe (Roberts, 1986).

3.2.2 Fixierung von Embryonen

Für die mRNA-Hybridisierung und Antikörperfärbungen wurden Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten ab Ablagebeginn mit Hilfe eines Pinselstumpfes von den Apfelsaft-Agarplatten entfernt und wie im Folgenden beschrieben fixiert. Die Embryonen wurden auf ein Netzfilter überführt und ausgiebig mit fließendem Wasser und Embryowaschlösung (145 mM NaCl, 0,03% Triton X-100) gewaschen. Anschließend wurde zur Entfernung des Chorions eine Hypochloridlösung aus 50% Klorix (Colgate-Palmolive, Hamburg) in H₂O auf die Embryonen gegeben und bei ständiger Perturbation 2-3 min einwirken gelassen. Die Dechorionierungslösung wurde durch ausgiebiges Waschen mit fließendem Wasser wieder entfernt und die Embryonen anschließend in ein Gefäß überführt, in das 4 ml Fixierungslösung (100 mM Hepes, 2 mM MgSO₄, 1 mM EGTA, pH 6,4) und 5 ml n-Heptan vorgelegt

worden waren. Es wurden 500 μ l einer 37%-igen Formaldehyd-Lösung hinzupipettiert, anschließend wurde 25 min unter starkem Schütteln fixiert. Nachdem sich die Phasen wieder getrennt hatten, wurde die untere, wäßrige Phase abgenommen und zur oberen Phase 10 ml Methanol gegeben. Zur Entfernung der Vitellinmembran wurde nun zwei Minuten lang heftig geschüttelt, der Methanol-Überstand anschließend bis auf ca. 1 ml abgesaugt und durch 10 ml frisches Methanol ersetzt. Das Ausschütteln der Vitellinmembran wurde für weitere 2 min fortgesetzt, das Methanol dann wiederum größtenteils abgesaugt und die Embryonen im verbliebenen Methanol bei -20°C gelagert.

3.2.3 *In-situ*-Hybridisierung an Embryonen

Um die räumliche und zeitliche Verteilung der endogenen *Bap60*-mRNA *in situ* sichtbar zu machen, wurde wie im Folgenden beschrieben eine Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter Komplementär-RNA durchgeführt. Alle Waschschritte erfolgten, falls nicht anders angegeben, in einem Volumen von 1 ml.

Fixierte, in Methanol gelagerte Embryonen wurden zuerst in 50% Methanol/PBT (PBS mit 0,1% Tween 20), dann in 100% PBT gewaschen, anschließend in einer Mischung von 500 μ l PBT und 500 μ l Fixierungslösung (PBS mit 10% Formaldehyd, 50 mM EGTA) 20 min auf dem Drehrad nachfixiert. Es wurde viermal mit PBT gewaschen, dann 5 min in 1 ml PBT mit 25 μ g/ml Proteinase K inkubiert. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit 2 mg/ml Glyzin in PBT abgestoppt. Anschließend wurde abermals wie beschrieben nachfixiert und gewaschen. Es folgte ein schrittweiser Austausch des Puffers gegen Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC (Sambrook und Russell, 2001), 50 μ g/ml Heparin, 200 μ g/ml Torulahefe-RNA, pH 5,0) und eine sich anschließende Vorinkubation im Wasserbad bei 55°C.

Die Hybridisierungslösung wurde so weit wie möglich abpipettiert und durch 30 μ l neue Hybridisierungslösung ersetzt. Zu dieser wurde 1 μ l einer 1:30-Verdünnung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde gegeben (Abschnitt 3.3.4). Es wurde über Nacht bei 55°C im Wasserbad hybridisiert. Am nächsten Tag wurde dreimal 20 min mit je 500 μ l Hybridisierungslösung bei 55°C gewaschen. Danach wurde mit einer Mischung von 500 μ l PBT und 500 μ l Hybridisierungslösung gewaschen und

anschließend fünfmal mit PBT, wobei die letzten beiden Waschschritte über 15 und 20 min hinweg durchgeführt wurden. Es wurde schließlich eine Stunde lang mit 1 ml einer Lösung Alkalische-Phosphatase-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpers (1:2000 in PBT; Roche Diagnostics, Mannheim) bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Nach Abnahme der Antikörper-Lösung wurden die Embryonen dreimal kurz mit PBT gewaschen, dann einmal 20 min und einmal 30 min lang. Danach wurde zweimal mit AP-Färbepuffer (100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 1mM Levamisol) gewaschen und das Hybridisierungssignal schließlich durch Inkubation in 1 ml AP-Färbepuffer versetzt mit 4,5 µl NBT-Lösung (75 mg/ml NBT in 70% DMF) und 3,5 µl X-Phosphat-Lösung (50 mg/ml in 100% DMF) sichtbar gemacht.

Die Färbereaktion wurde durch zweimaliges kurzes Waschen in PBT gestoppt, gefolgt von einem 20-min-Waschschritt mit PBT. Die Embryonen wurden nun schrittweise durch ansteigende Ethanol-Konzentrationen dehydriert, und nach Erreichen von 100% Ethanol wiederum schrittweise in Roticlear (Carl Roth, Karlsruhe) überführt. Es folgte eine Einbettung der Embryonen in Kanada-Balsam (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

PBS: 140 mM NaCl
10 mM Natriumphosphat
pH 7,4

3.2.4 Antikörperfärbung an Embryonen

Fixierte und in Methanol gelagerte Embryonen wurden dreimal 5 min in je 1 ml BBT (10 mM Tris pH 6,95, 55 mM NaCl, 40 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 20 mM Glucose, 50 mM Sucrose, 0,1% BSA, 0,1% Tween 20) bei Rotation auf einem Drehrad gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper (Tabelle 3-2) verdünnt in 500 µl BBT zu den Embryonen gegeben. Es wurde über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, danach erst zweimal 10 min mit je 1 ml BBT, dann zweimal 20 min mit je 500 µl BBT + 2% Schafserum gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und 10 µl eines Biotin-gekoppelten sekundären Antikörpers (ABC Vectastain Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verdünnt in

390 μ l BBT + 2,5% Schafserum auf die Embryonen gegeben. Es wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Drehen inkubiert, anschließend viermal 10 min mit 1 ml PBT gewaschen. Es folgte die Zugabe von 500 μ l einer Lösung eines Peroxidase-Streptavidin-Komplexes, welche zuvor durch Mischung der Biotin-Peroxidase- und Streptavidin-Komponenten in PBT erzeugt wurde (ABC Vectastain Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die Embryonen wurden eine Stunde unter Drehen mit dem Komplex inkubiert, dann wurde abermals viermal 10 min mit 1 ml PBT gewaschen. Danach erfolgte der Ansatz der Färbereaktion in 500 μ l PBT, versetzt mit 30 μ l DAB-Lösung (10 mg/ml in 50 mM Tris pH 7,5) und 10 μ l H₂O₂ (1:100 in PBT verdünnt). Die Färbung wurde durch Abpipettieren der Färbelösung und anschließendes Waschen mit PBT gestoppt. Die Embryonen wurden über eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert und anschließend in Kanada-Balsam (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingebettet.

Tabelle 3-2 Übersicht der verwendeten Primärantikörper.

Antikörperbezeichnung	Beschreibung	Referenz
1D4	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Fasciclin II; eingesetzt 1:40	van Vactor <i>et al.</i> , 1993
22C10	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen Futsch/22C10; eingesetzt 1:100	Fujita <i>et al.</i> , 1982
anti-MHC	Kaninchen-Antiserum gegen die schwere Kette des Myosins; eingesetzt 1:2000	Kiehart und Feghali, 1986

3.2.5 Kutikulapräparation

Von Eiablagen auf Apfelsaft-Agarplatten wurden nach mindestens 24-stündiger Nachalterung geschlüpfte Larven durch Aufschwemmen in Wasser entfernt. Die ungeschlüpften Embryonen wurden wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben dechorioniert und devitellinisiert. Nach mehrmaligem Waschen in Methanol und

einmaligem Waschen in PBT wurden die Embryonen auf Objektträger gebracht und überschüssige Flüssigkeit entfernt. Anschließend wurde ein Tropfen Hoyers Medium (30g Gummi arabicum, 200 g Chloralhydrat, 20 g Glycerol, 50 ml H₂O, 1:1 mit Milchsäure gemischt) auf die Embryonen gegeben und das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden mit einem Gewicht beschwert und über Nacht bei 65°C inkubiert. Die geklärten Kutikulae wurden schließlich mikroskopisch im Dunkelfeld betrachtet.

3.2.6 Isolierung intakter Speicheldrüsen-Kerne

Kreuzungsansätze von Fliegen, die das *UAS*-kontrollierte GFP-Fusionskonstrukt trugen, mit Fliegen, welche den Speicheldrüsen-spezifischen *Sgs3-Gal4*-Treiber trugen, wurden jeden Tag bei 25°C umgesetzt, die Röhrchen mit den abgelegten Eiern dann bei 18°C weiterinkubiert. Nach ca. zehn Tagen wurden späte Larven, die das grün fluoreszierende Protein GFP in den Kernen der Speicheldrüsen exprimierten, durch Betrachtung unter einem Fluoreszenz-Binokular (Leica M2 FLIII; Leica Microsystems, Wetzlar) identifiziert und die Speicheldrüsen dieser Larven in einem Puffer von PBS mit 1% Triton X-100 freipräpariert. Zehn Speicheldrüsen-Paare wurden in diesem Puffer für 1 min gevortext und die so freigesetzten Kerne anschließend durch Zentrifugation bei 1000 rpm sedimentiert. Nachdem die Kerne wieder in PBS resuspendiert worden waren, wurden sie auf einen Objektträger überführt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Analyse der Präparate erfolgte durch Epifluoreszenz-Mikroskopie (Axioskop 2 MOT; Carl Zeiss, Jena).

3.2.7 Herstellung von Chromosomen-Quetschpräparaten für die Immunfärbung

Bis zur Präparation der Speicheldrüsen wurde vorgegangen wie unter 3.2.6 beschrieben. Die Präparation erfolgte im gleichen Puffer aus PBS und 1% Triton X-100. Jeweils zwei Speicheldrüsen-Paare wurden in einer abgeschnittenen Pipettenspitze in 200 µl Fixierungslösung (3,7% Formaldehyd, 50% Essigsäure; das Formaldehyd wurde durch Auflösung von Paraformaldehyd gewonnen) überführt. Nach ca. 1 min wurden die Speicheldrüsen wiederum in einer abgeschnittenen Pipettenspitze mit 40 µl Fixierungslösung auf ein Deckglas (22 mm x 22 mm)

gebracht. Auf das Deckglas wurde anschließend ein mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) beschichteter Objektträger gelegt. Mit dem Radiergummi-Ende eines Stiftes wurden durch Klopfen auf das Deckglas die Speicheldrüsen und ihre Kerne aufgebrochen und die so freigesetzten Chromosomen gespreitet. Die erfolgreiche Spreitung wurde zwischendurch unter dem Mikroskop im Phasenkontrast überprüft. Der Objektträger wurde schließlich mit dem Deckglas nach unten auf Filterpapier aufgeschlagen und mit einer zweiten Lage Papier überschichtet. Mit den Daumen wurde starker Druck auf den Objektträger ausgeübt. Danach wurde die Spreitung und die Abflachung der Chromosomen noch einmal im Phasenkontrast überprüft. Die Objektträger wurden durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und die Deckgläser anschließend mit einem Skalpell abgesprengt.

3.2.8 Immunfärbung an polytären Chromosomen

Die Färbung wurde in Anlehnung an die Methode von Cavalli durchgeführt (<http://www.igh.cnrs.fr/equip/cavalli>). Die Objektträger mit den Chromosomen-Quetschpräparaten wurden zuerst zweimal 15 min in PBS gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Blockierung bei Raumtemperatur in einer Lösung aus PBS mit 3% BSA, 0,2% NP-40, 0,2% Tween 20 und 10% fettfreiem Milchpulver. Auf ein Deckglas (24 mm x 40 mm) wurden 50 μ l der primären Antikörper-Lösung (anti-GFP aus Kaninchen von Molecular Probes, Eugene, OR, USA; 1:500 in Blockierlösung verdünnt) vorgelegt. Auf das Deckglas wurde dann der Objektträger mit dem Quetschpräparat gelegt. Hierzu wurden die Objektträger zuvor kurz mit PBS abgespült und überflüssige Flüssigkeit anschließend wieder abgewischt. Dabei wurde das Areal der gespreiteten Chromosomen stets feucht belassen (so auch in allen nachfolgenden Schritten). Es folgte die Überführung der Objektträger in ein Gefäß, das mit nassem Papier ausgelegt worden war, und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Deckgläser wurden anschließend mit PBS wieder von den Objektträgern abgespült. Die Objektträger wurden dann jeweils 15 min unter kräftigem Schütteln einmal in Waschpuffer (PBS, 0,2% NP-40, 0,2% Tween 20) mit 300 mM NaCl und einmal in Waschpuffer mit 400 mM NaCl gewaschen. Wie für den primären Antikörper beschrieben, erfolgte nun die Inkubation mit der sekundären Antikörper-Lösung (Alexa 488-konjugierter anti-Kaninchen-IgG von Molecular

Probes, Eugene, OR, USA; 1:500 in Blockierlösung mit 2% Schafserum). Anschließend wurde wie nach der Inkubation mit dem primären Antikörper gewaschen. Als nächstes folgte eine zehnminütige Inkubation mit 40 μ l einer Lösung des DNA-Farbstoffs Hoechst 33258 (10 μ g/ml; Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Nach Abspülen der Färbelösung mit PBS wurden die Objektträger schließlich auf Deckgläser abgesenkt, auf denen zur Einbettung 40 μ l Mowiol-Lösung vorgelegt worden waren (4,8 g Mowiol (Merck Biosciences, Schwalbach), 12 ml Glycerol, 24 ml 200 mM Tris-HCl, pH 8,5). Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe der nachfolgend aufgeführten Filtersätze an dem Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Jena).

Alexa 488: Filtersatz 09 Blau-Anregung 450-490

Hoechst 33258: Filtersatz 01 UV-Anregung H 365

Die Ergebnisse wurden durch Aufnahme mit einer an das Mikroskop gekoppelten AxioCam-Digitalkamera (Carl Zeiss, Jena) und unter Verwendung der Software-Programme Openlab 3.0 (Improvision, Tübingen) und Photoshop 5.0 (Adobe Systems, Unterschleißheim) für das Macintosh-Betriebssystem dokumentiert und bearbeitet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

Die Herstellung rekombinanter DNA erfolgte in Anlehnung an Standardmethoden nach Sambrook und Russell (2001). DNA wurde im kleinen Maßstab mit Hilfe der Qiagen Mini Kits (Qiagen, Hilden) gewonnen. Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen erfolgte mittels des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden). Enzyme wurden entweder von New England Biolabs (Frankfurt a.M.), oder Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Für die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet.

3.3.1 Präparation genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus adulten Fliegen wurde das DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden

jeweils drei adulte Fliegen mit einem Stößel in PBS zerrieben und das resultierende Homogenat mit Hilfe der Kit-Komponenten weiterverarbeitet.

3.3.2 PCR

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion fand in dieser Arbeit Anwendung in der Erzeugung rekombinanter DNA sowie in der Charakterisierung der Deletion in *Bap60^l*-Fliegen. In beiden Fällen wurde die PCR mit Hilfe der HotstarTaq-Mischung von Qiagen (Hilden) unter Verwendung des PCR Express Thermocyclers von Hybaid (Heidelberg) durchgeführt. Die dabei verwendeten PCR-Programme sind nachfolgend dargestellt. Die verwendeten Primer sind im Anschluss aufgelistet; sie wurden mit Hilfe des Software-Programms Oligo 4.0 (National Biosciences, Plymouth, MN, USA) für das Macintosh-Betriebssystem entworfen und von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Die Primer wurden jeweils in einer Endkonzentration von 1 μ M eingesetzt.

a) PCR-Programm zur Deletions-Analyse (eingesetzte Menge genomischer DNA: ca. 100 ng)

1x	95°C	15 min
1x	75°C	2 min
8x	95°C	20 s
	59°C	1 min (in jeder Wiederholung 1°C weniger)
	65°C	9 min
30x	95°C	20 s
	52°C	1 min
	65°C	9 min
1x	72°C	10 min

b) PCR-Programm für die Erzeugung rekombinanter DNA (eingesetzte Menge Plasmid-DNA: 100-500 ng)

1x	95°C	15 min
1x	75°C	2 min
25x	95°C	20 s
	50-65°C	1 min

Temperatur variierte je nach Primerpaar

3. Material und Methoden

	72°C	1 min pro kb Produktlänge
1x	72°C	10 min

Tabelle 3-3 Übersicht der verwendeten PCR-Primer.

Name	Sequenz
<i>5NLS-BD</i>	CGCGAATTTCGCCAGCCATGCCAAAAAGAAGAGGAAGGTAGGTAGCAAAAGTGATTTTG CGACGG
<i>3BD</i>	CGCGGTACCTCCTCGCCATCATTTGTGGGCTCC
<i>CHis</i>	CGCCTCGAGCTAATGATGATGATGATGATGACCACCACCACCGCCGTTGCGTATGCCCA GCGCCTGC
<i>NFLAG</i>	CGCTCTAGAGCAAAGATGGACTACAAGGACGATGACGATAAGTCGCAACGCTTTGCACC TGGCCAAG
<i>T7</i>	AATACGACTCACTATAG
<i>Trunk1</i>	CGCGAATTTCAGCAAAGATGAAGAAGCTGGCCGAAAAGATACTGC
<i>Trunk2</i>	CGCCTCGAGCTAATTGGGATCGCCCTTGCCATCCTCT
<i>Trunk3</i>	CGCGAATTTCAGCAAAGATGACAAAGATCAAACGCAAGTTTTTCGTC
<i>Trunk8</i>	CGCCTCGAGCTAGGAGTTGCGTATGCCAGCGCCTGCTCCAATT
<i>Trunk9</i>	CGCGAATTTCAGCAAAGATGGGTAGCAAAAGTGATTTTTCGACGG
<i>Trunk10</i>	CGCCTCGAGCTACTCCTCGCCATCATTTGTGGGCTCC
<i>Pr-CG4331</i>	GTCTTCGGGCTGTACAAGGCCGACCTG
<i>Pr-CG12096</i>	ATGGCAGTGGGCAGAATACTCTCATCC
<i>EGFPN1-3</i>	AAATCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
<i>EGFPN1-5</i>	AAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGG
<i>sisA-5</i>	AGAATGCGGCCGCATGGAACGGAGTCATCTTTACTTGC
<i>sisA-3(2)</i>	CGCGGATCCCATATGCTACTGCTCCATTTCCAGGCCG
<i>sc-5</i>	AGAATGCGGCCGCATGAAAAATAATAATAATACAACG
<i>sc-3</i>	CGCCTCGAGCTACTGCTCCTGCCATAGAGAG

3.3.3 Mutagenese

Für die Erzeugung sequenzveränderter Formen des *Bap60*-Genproduktes wurden ortsgerichtete Mutagenesen unter Verwendung des QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Dabei

wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Mutagenesen wurden am Plasmid *pBS-Bap60* (Abschnitt 3.3.6) vorgenommen. Die in diesen Mutagenesen eingesetzten Primer sind in Tabelle 3-4 aufgelistet (synthetisiert durch die MWG-Biotech AG, Ebersberg).

Tabelle 3-4 Übersicht der verwendeten Mutagenese-Primer.

Name	Mutation	Sequenz
LRI5	R185A	CATGAAGCAGAAGCGCAAGCTCGCGATCTTCATCTCGAACACATTC
LRI3	R185A	GAATGTGTTCGAGATGAAGATCGCGAGCTTGCGCTTCTGCTTCATG
RKR5	K166A	CTGGATGCCACCATAATGCGTGACGTCTGGACATCCAGGAGGCC
RKR3	K166A	GGCCTCCTGGATGTCCAGACGTGCACGCATTATGGTGGCATCCAG
RKL5	K158A	GATCTGCTGACGTTTGAGCGTGCACTGGATGCCACCATAATGCGC
RKL3	K158A	GCGCATTATGGTGGCATCCAGTGCACGCTCAAACGTCAGCAGATC

3.3.4 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Für die *In-situ*-Hybridisierung zur Analyse des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters von *Bap60* wurde eine Digoxigenin-markierte RNA-Sonde verwendet. Sie wurde mit Hilfe des DIG RNA Labeling and Detection Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) unter Befolgung der Herstellerangaben erzeugt. Als Transkriptionsmatrize diente *SmaI*-verdaute DNA des cDNA-Plasmids *LD09078* (Abschnitt 3.3.6). Die Transkriptionsreaktion zur Erzeugung der Komplementär-Sonde wurde mit der dem Kit beigelegten T7-Polymerase durchgeführt.

3.3.5 Sequenzierungen

Für die Überprüfung der korrekten Sequenz nach einer vorangegangenen PCR, sowie für die Überprüfung der Mutagenesen, für die Analyse der Deletion in *Bap60^l* und zur Auswertung des SELEX-Experimentes wurden von Gordon Dowe (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) Sequenzierungen nach der Methode der Cycle Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurden der ABI Prism 377/96-Sequenzierautomat und das DNA Sequencing Kit von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)

verwendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Software-Programm Sequencher 4.1 (GeneCodes, Ann Arbor, MI, USA) für das Macintosh-Betriebssystem ausgewertet.

3.3.6 Plasmide

In Tabelle 3-5 sind die in dieser Arbeit verwendeten und klonierten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 3-5 Übersicht der verwendeten und klonierten Plasmide.

Name	Beschreibung/ Referenz	Klonierungsweg
<i>LD09078</i>	<i>Bap60</i> cDNA-Klon; Rubin <i>et al.</i> , 2000	-
<i>pCaSpeR4 (pC4)</i>	Pirrota, 1988	-
<i>pC4-act-KAP3</i>	Peter, 2001	-
<i>pC4-act-Bap60</i>	Ubiquitäre Expression von <i>Bap60 in vivo</i>	<i>Bap60</i> aus <i>LD09078</i> über <i>XhoI/XbaI</i> in <i>pC4</i> einkloniert; <i>act</i> über <i>EcoRI</i> aus <i>pC4-act-KAP3</i> in <i>pC4-</i> <i>Bap60</i> einkloniert
<i>pC4-act</i>	Zwischenprodukt der Klonierung	<i>act</i> über <i>EcoRI</i> aus <i>pC4-</i> <i>act-KAP3</i> in <i>pCaSpeR4</i> einkloniert
<i>pC4-act-Bap60(K158A)</i>	Ubiquitäre Expression von mutiertem <i>Bap60</i> <i>in vivo</i>	<i>Bap60(K158A)</i> über <i>XhoI/XbaI</i> aus mutagen- isiertem <i>pBS-Bap60</i> in <i>pC4-</i> <i>act</i> einkloniert
<i>pC4-act-Bap60(R185A)</i>	Ubiquitäre Expression von mutiertem <i>Bap60</i> <i>in vivo</i>	<i>Bap60(R185A)</i> über <i>XhoI/XbaI</i> aus mutagen- isiertem <i>pBS-Bap60</i> in <i>pC4-</i> <i>act</i> einkloniert
<i>pEGFP-N1</i>	BD Biosciences, Heidelberg	-

Tabelle 3-5 (Fortsetzung)

<i>pUAST</i>	Brand und Perrimon, 1993	-
<i>pUAST-DBD.nls-EGFP</i>	UAS-abhängige Expression der BAP60-DBD, fusioniert an GFP und mit Kernsignal versehen	PCR mit <i>5NLS-BD</i> und <i>3BD</i> auf <i>LD09078</i> , dann Klonierung über <i>KpnI/EcoRI</i> in <i>pUAST</i> ; PCR mit <i>EGFPN1-3</i> und <i>EGFPN1-5</i> auf <i>pEGFP-N1</i> , dann Klonierung über <i>KpnI/XbaI</i> in <i>pUAST-DBD.nls</i>
<i>pUAST-DBD(K158A).nls-EGFP</i>	UAS-abhängige Expression der mutierten BAP60-DBD, fusioniert an GFP und mit Kernsignal versehen	PCR mit <i>5NLS-BD</i> und <i>3BD</i> auf <i>pC4-act-Bap60(K158A)</i> , dann Klonierung über <i>KpnI/EcoRI</i> in <i>pUAST-DBD.nls-EGFP</i>
<i>pUAST-DBD(R185A).nls-EGFP</i>	UAS-abhängige Expression der mutierten BAP60-DBD, fusioniert an GFP und mit Kernsignal versehen	PCR mit <i>5NLS-BD</i> und <i>3BD</i> auf <i>pC4-act-Bap60(R185A)</i> , dann Klonierung über <i>KpnI/EcoRI</i> in <i>pUAST-DBD.nls-EGFP</i>
<i>pGEX-BCD-HD</i>	Bakterielle Expression der BCD-Homöodomäne; Von U. Schmidt-Ott erhalten (University of Chicago, IL, USA)	-
<i>pGEX-4T-3</i>	Amersham Biosciences, Freiburg	-
<i>pGEX-Bap60</i>	Bakterielle Expression von GST-BAP60	Indirekt PCR mit <i>CHis</i> und <i>NFLAG</i> auf <i>LD09078</i> , dann Klonierung in <i>pGEX-4T-3</i> (über <i>EcoRI/XbaI</i> -Fill-in am 5', über <i>XhoI</i> -Verdau am 3')
<i>pBS</i>	Stratagene, Amsterdam, Niederlande	-

Tabelle 3-5 (Fortsetzung)

<i>pBS-Bap60</i>	Zwischenprodukt der Klonierung	PCR mit <i>NFLAG</i> und <i>T7</i> auf <i>LD09078</i> , dann über <i>XbaI/XhoI</i> in <i>pBS</i> einkloniert
<i>pGEX-Bap60(K158A)</i>	Bakterielle Expression von mutiertem GST-BAP60	<i>Bap60(K158A)</i> über <i>KpnI/HindIII</i> aus mutagenisiertem <i>pBS-Bap60</i> in <i>pGEX-Bap60</i> einkloniert
<i>pGEX-Bap60(K166A)</i>	Bakterielle Expression von mutiertem GST-BAP60	<i>Bap60(K166A)</i> über <i>KpnI/HindIII</i> aus mutagenisiertem <i>pBS-Bap60</i> in <i>pGEX-Bap60</i> einkloniert
<i>pGEX-Bap60(R185A)</i>	Bakterielle Expression von mutiertem GST-BAP60	<i>Bap60(R185A)</i> über <i>KpnI/HindIII</i> aus mutagenisiertem <i>pBS-Bap60</i> in <i>pGEX-Bap60</i> einkloniert
<i>pGEX-128-227</i>	Bakterielle Expression eines BAP60-Fragmentes	PCR mit <i>Trunk1</i> und <i>Trunk2</i> auf <i>LD09078</i> , dann über <i>EcoRI/XhoI</i> in <i>pGEX-4T-3</i> einkloniert
<i>pGEX-1-227</i>	Bakterielle Expression eines BAP60-Fragmentes	PCR mit <i>NFLAG</i> und <i>Trunk2</i> auf <i>LD09078</i> , dann über <i>EcoRI/XhoI</i> in <i>pGEX-4T-3</i> einkloniert
<i>pGEX-128-515</i>	Bakterielle Expression eines BAP60-Fragmentes	PCR mit <i>Trunk1</i> und <i>Trunk8</i> auf <i>LD09078</i> , dann über <i>EcoRI/XhoI</i> in <i>pGEX-4T-3</i> einkloniert
<i>pGEX-98-227</i>	Bakterielle Expression eines BAP60-Fragmentes	<i>pGEX-1-227</i> <i>BamHI</i> -verdaut und Vektor anschließend religiert
<i>pGEX-98-204</i>	Bakterielle Expression eines BAP60-Fragmentes	PCR mit <i>NFLAG</i> und <i>Trunk10</i> auf <i>LD09078</i> , dann über <i>BamHI/XhoI</i> in <i>pGEX-4T-3</i> einkloniert

Tabelle 3-5 (Fortsetzung)

<i>pGEX-116-204</i>	Bakterielle Expression eines BAP60-Fragmentes	PCR mit <i>Trunk9</i> und <i>Trunk10</i> auf <i>LD09078</i> , dann über <i>EcoRI/XhoI</i> in <i>pGEX-4T-3</i> einkloniert
<i>pIVEX2.4d</i>	Roche Diagnostics, Mannheim	-
<i>pIVEX2.4d-sisA</i>	<i>In-vitro</i> -Expression von SISA	PCR mit <i>sisA-5</i> und <i>sisA-3(2)</i> auf genomischer DNA, dann über <i>NotI/NdeI</i> in <i>pIVEX2.4d</i> einkloniert
<i>pIVEX2.4d-sc</i>	<i>In-vitro</i> -Expression von SC	PCR mit <i>sc-5</i> und <i>sc-3</i> auf genomischer DNA, dann über <i>NotI/XhoI</i> in <i>pIVEX2.4d</i> einkloniert
<i>pcDNA-Mad</i>	<i>In-vitro</i> -Expression von MAD; Von M. Beller erhalten (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen)	-

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine

GST-Fusionsproteine von Volllängen-BAP60 bzw. von BAP60-Fragmenten wurden für die Analyse ihrer DNA-Bindungseigenschaften im *Escherichia coli*-Stamm BL21(DE3)Lys (Invitrogen, Karlsruhe) exprimiert. Hierzu wurden 50 μ l chemo-kompetente Zellen dieses Stammes mit 100-500 ng des jeweiligen Expressions-plasmids (Abschnitt 3.3.6) transformiert und anschließend in 100 ml LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C und 280 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml LB-Medium mit der Übernachtskultur angeimpft, so dass sich eine OD₆₀₀ von ca. 0,005 ergab. Die Kultur wurde bei 37°C und 280 rpm so lange inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,4 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurde zur Induktion der Proteinexpression IPTG in einer Endkonzentration von 0,4 mM in die Kultur gegeben und die Temperatur auf 30°C abgesenkt. Nach dreistündiger

Expression wurden die Zellen bei 6000 rpm abzentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.2 Reinigung rekombinanter Proteine

Die Reinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe einer Glutathion-vermittelten Affinitätsreinigung. Abzentrifugierte Zellen wurden in 2,5 ml Lysispuffer (25 mM Hepes-KOH, 0,1 mM EDTA, 12,5 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 0,1% NP-40, 10% Glycerol, pH 7,6) resuspendiert, mit 10 µl 50 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Zellen wurden durch viermaliges Beschallen (jeweils 30 s) mit einem Branson Sonifier 250 (G. Heine-mann, Schwäbisch Gmünd) auf Eis aufgebrochen und Zelltrümmer durch Zentri-fugation entfernt (30 min 15000 rpm). Zum Überstand wurden 25 µl Glutathion-4-B-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben. Es folgte eine mindestens einstündige Inkubation unter Drehen bei 4°C. Zwischen den nun folgenden Waschschritten wurde die Sepharose jeweils durch einminütige Zentrifugation bei 500 g sedimentiert. Die Sepharose wurde dreimal mit je 250 µl Lysispuffer und dreimal mit je 250 µl Waschpuffer (25 mM Hepes-KOH, 0,1 mM EDTA, 12,5 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 0,01% NP-40, 10% Glycerol, pH 7,6) gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose je nach Verwendungszweck des Proteins entweder in gleichem Volumen Waschpuffer aufgenommen und bei -80°C weggefroren oder sie wurde zweimal hintereinander mit einem gleichen Volumen Elutionspuffer (25 mM Hepes-KOH, 0,1 mM EDTA, 12,5 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 0,1% NP-40, 10% Glycerol, 50 mM reduziertes Glutathion, pH 7,6) versetzt und jeweils 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elutionsüberstände wurden dann vereint und bei -80°C gelagert.

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration im Elutionspuffer der GST-Affinitätsreinigung oder an der nicht-eluierten Sepharose wurde densitometrisch gegen BSA bestimmt. Hierzu wurden verschiedene Lösungsvolumina zusammen mit 100 bis 800 ng BSA in einer SDS-PAGE (Sambrook und Russell, 2001) aufgetrennt. Die eingesetzten Volumina

der zu bestimmenden Lösung wurden so gewählt, dass die enthaltene Proteinmenge ebenfalls innerhalb eines Bereichs von 100 bis 800 ng fallen sollte. Die Gele wurden anschließend mit Hilfe des GelCode Protein Stains (Perbio Science, Bonn) nach Angaben des Herstellers gefärbt und dann an einem LAS-1000plus-Bildanalysegerät (Fuji Photo Film, Düsseldorf) digitalisiert. Die Intensitäten der einzelnen Proteinbanden wurden mit dem Software-Programm ImageGauge V3.45 (Fuji Photo Film, Düsseldorf) für das Macintosh-Betriebssystem bestimmt. Die ermittelten Bandenintensitäten des BSA dienten als Eichwerte, welche über lineare Regression zur ungefähren Bestimmung der Menge der mitaufgetragenen Proteine verwendet wurden.

3.4.4 DNA-Coimmunopräzipitation

Die DNA-Coimmunopräzipitation zum Nachweis allgemeiner DNA-Bindung durch BAP60 wurde nach einem Protokoll von P. J. Shaw (University of Leicester, UK) durchgeführt. Hierzu wurde DNA eines *pGEM-T*-Plasmids (Promega, Mannheim), in welches Teile des *hunchback*-Promotors aus *Clogmia spec.* einkloniert waren (zur Verfügung gestellt von A. Prell, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen), zunächst mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut, so dass sich Fragmentgrößen zwischen 50 und 4000 bp ergaben. 1 bis 2 μg des verdauten Plasmids wurden mit Hilfe der Polynukleotid-Kinase (Fermentas, St. Leon-Rot) unter Befolgung der Herstellerangaben und unter Verwendung von $\gamma(^{33}\text{P})\text{ATP}$ (Hartmann Analytic, Braunschweig) radioaktiv markiert. Die DNA wurde Ethanol-präzipitiert und anschließend in 100 μl H_2O aufgenommen. 200 μl Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) wurde mit ACW-Puffer (20 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 1mM DTT, 10% Glycerol) äquilibriert und anschließend mit 10 μl eines polyklonalen anti-GST-Antiserums aus Kaninchen (zur Verfügung gestellt von P. J. Shaw, University of Leicester, UK) versetzt. Nach einstündiger Inkubation unter Drehen bei 4°C wurde die Sepharose dreimal mit je 1 ml ACW-Puffer gewaschen und schließlich in 200 μl ACW-Puffer aufgenommen. Die auf ihre DNA-Bindung hin zu untersuchenden Proteine wurden aus GST-Affinitätsaufreinigungen (Abschnitt 3.4.2) gewonnen und zunächst in Slide-A-Lyzer Mini Units (10000 MWCO; Perbio Science, Bonn) gegen ACW-Puffer

dialysiert. Nach einer densitometrischen Proteinbestimmung (Abschnitt 3.4.3) wurden 300 ng Protein mit 1 bis 5 μ l markierter DNA in ACW-Puffer (Gesamtvolumen der Reaktion: 50 μ l) für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 μ l der Suspension Antikörper-gekoppelter Protein-A-Sepharose und eine weitere Inkubation für mindestens 30 min auf dem Drehrad bei 4°C. Die Sepharose wurde nun nach Zugabe von 425 μ l ACW-Puffer durch einminütige Zentrifugation bei 15000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufbewahrt, die Sepharose in 500 μ l des ersten Waschpuffers (ACW mit 200 mM NaCl) resuspendiert und 5 min bei 4°C unter Drehen inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation zur Sedimentation der Sepharose sowie in gleicher Weise durchgeführte weitere Waschschrte mit Puffer höherer NaCl-Konzentration. Die Überstände der Waschschrte wurden dabei jeweils aufbewahrt. Mitunter wurde die Sepharose in einem letzten Schritt mit 500 μ l Elutionspuffer (50 mM Tris pH 7,5, 1% SDS, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml Glykogen) versetzt und für 5 min bei 37°C erhitzt. Die Überstände der Bindungs-, Wasch- und Elutionsschrte wurden schließlich in Anwesenheit von Glykogen Ethanol-präzipitiert und in 8 μ l H₂O aufgenommen. Die DNA wurde in einem 4%-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und nach Trocknung des Gels auf Filterpapier mit Hilfe des Phosphorimagers BAS-2500 (Fuji Photo Film, Düsseldorf) sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.4.5 SELEX

Zur Identifikation etwaiger Zielsequenzen der BAP60-DBD wurde ein SELEX-Experiment in Anlehnung an Jun und Desplan (Jun und Desplan, 1996) durchgeführt. Hierzu wurde zuerst eine Bibliothek vollständig randomisierter doppelsträngiger DNA hergestellt: jeweils 40 pmol der Oligonukleotide *sellibF* und *selR* wurden mit 5 U Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und 200 mM dNTPs (Amersham Biosciences, Freiburg) in einer 50- μ l-Reaktion erst 1 min bei 94°C, dann 1 min bei 45°C und schließlich 2 min bei 72°C erhitzt. Die Proteinkonzentration von an Glutathion-4B-Sepharose-gebundener GST-DBD (Abschnitt 3.4.2) wurde densitometrisch bestimmt (Abschnitt 3.4.3) und durch Verdünnung mit einer 50%-igen Glutathion-4B-Sepharose-Suspension auf 66 ng pro 20 μ l Sepharose-Suspension eingestellt. 12,5 μ l der Bibliothek wurden nun mit 20 μ l der GST-DBD-Sepharose-

Suspension in 100 μ l Waschpuffer (20 mM Tris pH 8,0, 40 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 5% Glycerol, 20 μ g/ml BSA, 2 μ g/ml poly(dIdC), 0,5 mM DTT) vermischt und 20 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurde dreimal mit je 300 μ l Waschpuffer gewaschen, die Sepharose schließlich in 30 μ l H₂O aufgenommen und 3 min bei 95°C erhitzt. Mit 7,5 μ l des Überstandes wurde anschließend eine PCR mit den Oligonukleotiden *selF* und *selR* (je 50 pmol), 5 U Taq-Polymerase und 200 μ M dNTPs in einem 50- μ l-Reaktionsansatz nach folgendem Programm durchgeführt: 94°C 1 min, 19x (94°C 30 s, 44°C 30 s, 72°C 1 min), 72°C 2 min. Anschließend wurden 12,5 μ l des PCR-Produktes in einer weiteren Runde der SELEX eingesetzt. Der Prozess wurde über weitere Runden wiederholt, bis nach einer PCR schließlich 3 bis 5 μ l des PCR-Produktes mit Hilfe des TOPO-TA Kits (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) kloniert wurden. Die Plasmide einzelner Bakterienkolonien wurden durch Sequenzierung analysiert. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3-6 aufgeführt (synthetisiert durch die MWG-Biotech AG, Ebersberg).

Tabelle 3-6 Übersicht der im SELEX-Experiment verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz
<i>selF</i>	CTCCTATACTGAGTTCATGA
<i>selR</i>	CATCGATACAGTTCGATATCA
<i>sellibF</i>	CTCCTATACTGAGTTCATGAT (N20) TGATATCGAACTGTATCGATG

3.4.6 EMSA

Zur Überprüfung der aus der SELEX gewonnenen putativen Bindungsmotive wurden EMSA-Experimente durchgeführt. Die in diesen Experimenten verwendeten DNA-Sequenzen sind in Tabelle 3-7 aufgelistet. Es handelt sich dabei um jene nach der SELEX identifizierten Sequenzen, welche laut Patser-Analyse die größte Ähnlichkeit mit den jeweiligen putativen Bindungsmotiven aufweisen. In einem ersten Schritt wurden die Oligonukleotide (synthetisiert durch die MWG-Biotech AG, Ebersberg) in den doppelsträngigen Zustand überführt. Hierzu wurden die komplementären Oligonukleotide bei einer Konzentration von jeweils 100 μ M in 100 μ l NEB-Puffer 2 (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) gemischt, für 5 min auf 95°C erhitzt und dann

über zwei Stunden hinweg langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Tabelle 3-7 Übersicht der in den EMSA-Experimenten verwendeten Oligonukleotide.

Motiv #	Erstes Oligonukleotid	Zweites Oligonukleotid
1	GGAGATGAATGCAAGTTAGCACAAAGTT	GGGAACTTGTGCTAACTTGCATTCATC
2	GGAGATTCCCTAGCAGAGAGGGACGAGTG	GGGCACTCGTCCCTCTCTGCTAGGAATC
3	GGAGATTAATATTCCAAACCGCGAGAT	GGGATCTCGCGGTTTGGAAATATTAATC
4	GGATCATGTTGTACCGCCGGTATTGGAG	GGGCTCCAATACCGGCGGTACAACATGA
5	GGATCATTCATCAGCTACAATGCGTCAG	GGGCTGACGCATTGTAGCTGATGAATGA
6	GGATCAGCCGAAACATAGGACCCTAGAG	GGGCTCTAGGGTCCTATGTTTCGGCTGA
7	GGAGATCAATCACAGTCGGCCATAAAT	GGGATTTATGGCCGACTGTGATTGATC

Anschließend wurden 5 μ l der so erzeugten Duplex-DNA-Lösungen zur radioaktiven Markierung mit 4,5 μ l NEB-Puffer 2, 0,6 μ l d(A, T, G)TP-Mischung (je 33 mM; Amersham Biosciences, Freiburg), 5 μ l 32 P-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig), 2 μ l Klenow-Enzym (2 U/ μ l; Amersham Biosciences, Freiburg) und 32,9 μ l H₂O vermischt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37°C wurden die Sonden mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers gereinigt und mit 200 μ l Elutionspuffer eluiert. Die Volumenaktivität der Sonden wurde mit Hilfe eines Szintillationsmessgerätes (Tri-Carb 2100TR; Canberra Eurisys, Rüsselsheim) bestimmt und lag bei ca. 10000 dpm/ μ l. Das in den EMSA-Experimenten eingesetzte Protein stammte aus GST-Affinitätsreinigungen (Abschnitt 3.4.2). Nach Elution des Proteins von der Glutathion-4B-Sepharose wurde die Konzentration densitometrisch bestimmt (Abschnitt 3.4.3). Um die Bindung der freien Domäne zu untersuchen wurde ein Verdau des eluierten GST-DBD-Proteins mittels Thrombin (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der in den Versuchen verwendete zweifach konzentrierte Bindungspuffer hatte folgende Zusammensetzung: 40 mM Hepes pH 7,6, 80 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% Glycerol, 4 mM DTT, 2,8 mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100. Markierte DNA und Protein wurden in 30- μ l-Ansätzen in einfach konzentriertem Bindungspuffer zusammengebracht und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend komplett auf ein 5-

oder 10%-iges Polyacrylamid-Gel geladen. Nach Beendigung des Gellaufs und Trocknung des Gels auf Filterpapier wurde die DNA mit Hilfe des Phosphorimagers BAS-2500 (Fuji Photo Film, Düsseldorf) sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.4.7 Untersuchung von Proteinwechselwirkungen

Um etwaige direkte Interaktionen zwischen BAP60 und verschiedenen Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden *In-vitro*-Bindungsversuche mit dem GST-BAP60-Fusionsprotein durchgeführt. Dazu wurde GST-BAP60 wie in den Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben mit Hilfe des Plasmids *pGEX-Bap60* (Abschnitt 3.3.6) bakteriell exprimiert und anschließend aufgereinigt. Die Konzentration des Proteins wurde durch Verdünnung auf 5 µg pro 10 µl Sepharose-Suspension eingestellt. Die auf eine Bindung an BAP60 hin zu untersuchenden Proteine wurden unter Verwendung des TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems von Promega (Mannheim) mit Hilfe der Plasmide *pIVEX2.4d-sisA*, *pIVEX2.4d-sc* und *pcDNA-Mad* (Abschnitt 3.3.6) *in vitro* hergestellt. Dabei wurden die Proteine durch Einbau von [³⁵S]Methionin (Amersham Biosciences, Freiburg) radioaktiv markiert. Im Anschluss wurden 10 µl GST- oder GST-BAP60-Sepharose-Suspension mit 5 µl des jeweiligen *In-vitro*-Translationsproduktes in 500 µl Bindungspuffer (50 mM Hepes-KOH pH 7,9, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 1% Triton X-100) vermischt und eine Stunde bei 4°C unter Drehen inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit je 500 µl Bindungspuffer wurde die Sepharose-Matrix in 10 µl zweifach konzentrierten SDS-Ladungspuffers aufgenommen, aufgekocht und auf ein SDS-PAGE-Gel (Sambrook und Russell, 2001) geladen. Nach Auftrennung der Proteine und Trocknung des Gels auf Filterpapier wurden die *in vitro* translatierten Proteine autoradiographisch unter Verwendung von Kodak BioMax XAR-Filmen (Kodak, Stuttgart) und dem Optimax Typ TR-Entwicklungsgerät (MS-Laborgeräte, Wiesloch) sichtbar gemacht.

3.5 Bioinformatik

Die in Tabelle 3-8 aufgeführten bioinformatischen Algorithmen wurden an verschiedenen Punkten dieser Arbeit für Sequenzanalysen verwendet. Ihre

Anwendung erfolgte gemäß der den Algorithmen beigestellten Dokumentation und orientierte sich an den jeweiligen Standardeinstellungen.

Tabelle 3-8 Übersicht der verwendeten bioinformatischen Algorithmen.

Name	Referenz	Zugang
BLAST	Altschul <i>et al.</i> , 1997	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
PSI-BLAST	Altschul <i>et al.</i> , 1997	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Clustal W 1.81	Thompson <i>et al.</i> , 1997	Software-Programm ClustalX für das Macintosh-Betriebssystem (J. Thompson, Universität Strassburg, Frankreich)
MEME	Bailey und Elkan, 1994	http://meme.sdsc.edu/meme/website/
Patser	Hertz und Stormo, 1999	http://rsat.scmbb.ulb.ac.be/rsat/

4. Diskussion

Die Verpackung nukleärer DNA in den Strukturen des Chromatins hat direkte Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität der Gene. Die Kontrolle des Verpackungszustandes einzelner Gen-Loci stellt daher eine Möglichkeit zur transkriptionellen Regulation dar. Verschiedene Chromatin-remodellierende Aktivitäten sind an der Veränderung der Chromatin-Struktur auf nukleosomaler Ebene beteiligt. Dazu zählen Histon-modifizierende Proteine und Protein-Komplexe, die unter Aufwendung von ATP die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA erhöhen können.

Der Brahma-Komplex von *Drosophila melanogaster* gehört der Gruppe ATP-abhängiger Chromatin-remodellierender Komplexe des SWI/SNF-Typs an. Er spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Fliege und ist auch an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Neben der katalytischen Untereinheit BRM sind drei weitere Untereinheiten in allen homologen Komplexen eukaryotischer Organismen hochkonserviert: MOR, SNR1 und BAP60. Allerdings reichen bereits die BRM-, MOR-, und SNR1-Homologe aus um einen Komplex zu bilden, der *in vitro* die Aktivität des nativen Komplexes besitzt (Phelan *et al.*, 1996). Dies stellte die Zugehörigkeit der BAP60-Untereinheit zum funktionellen Kern des Komplexes in Frage.

In Bezug auf die Komplexe des SWI/SNF-Typs zeichnet sich *Drosophila* im Vergleich zu anderen genetischen Modellsystemen dadurch aus, dass die zugehörigen Untereinheiten von nur jeweils einem Gen codiert werden (Papoulas *et al.*, 1998). Dies ermöglicht genetische Ansätze zur Untersuchung ihrer funktionellen Relevanz *in vivo*. BAP60 stellt die einzige der konservierten Untereinheiten des Brahma-Komplexes dar, die aufgrund des Fehlens einer entsprechenden Mutante *in vivo* funktionell noch nicht untersucht wurde. Ihre Charakterisierung war wichtig in Hinblick auf die Frage, ob und in welchem Zusammenhang BAP60 an der Wirkung des Brahma-Komplexes *in vivo* beteiligt ist.

4.1 Die funktionelle Relevanz von BAP60 *in vivo*

Als erster Schritt in der Untersuchung der Bedeutung von BAP60 *in vivo* wurde das Expressionsmuster der *Bap60*-mRNA während der embryonalen Entwicklungsphase analysiert (siehe Abschnitt 2.1). Das Muster sollte Aufschluss darüber geben, ob das

Bap60-Transkript eine ähnliche zeitliche und räumliche Verteilung aufweist wie die Transkripte anderer Brahma-Untereinheiten. Mit den in Abschnitt 2.1 dargestellten Einschränkungen könnte daraus auf eine Kolo-kalisation der entsprechenden Proteine geschlossen werden. Eine solche Kolo-kalisation würde schließlich zu der Annahme führen, dass eine funktionelle Interaktion der Proteine in den entsprechenden Geweben tatsächlich möglich ist. Sollte sich das *Bap60*-Transkript nur in einem Teil der Gewebe zeigen, welche eine Expression der anderen Brahma-Untereinheiten aufweisen, würde dies darüber hinaus gegen eine generelle Funktion von BAP60 für den Komplex sprechen.

Transkripte des *brm*-Gens weisen eine ubiquitäre Lokalisierung in den Stadien des Blastoderms und des verlängerten Keimbandes auf, in späteren Stadien beschränkt sich die sichtbare Expression auf den ventralen Nervenstrang und auf das Gehirn und ist in sehr späten Embryonen schließlich gänzlich verschwunden (Elfring *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu diesem mRNA-Muster zeigt sich das BRM-Protein in Antikörperfärbungen an ganzen Embryonen während der gesamten Embryogenese ubiquitär und ist in späten Stadien nur schwach im zentralen Nervensystem (ZNS) angereichert (Elfring *et al.*, 1998). Das MOR-Protein sowie das *mor*-Transkript zeigen eine äquivalente ubiquitäre Expression im frühen Embryo sowie eine spätere Anreicherung im ZNS (Crosby *et al.*, 1999), zusätzlich sind Protein und Transkript im Darm angereichert. Auch SNR1 (Dingwall *et al.*, 1995) und BAP111 (Papoulas *et al.*, 2001) weisen eine frühe ubiquitäre Expression und eine spätere Anreicherung im embryonalen ZNS auf. Mit dem in Abb. 2-2 dargestellten Expressionsmuster reiht sich *Bap60* in diese Liste ein. Das *Bap60*-Transkript weist ebenfalls eine frühe ubiquitäre sowie eine späte, auf das ZNS beschränkte Komponente auf. In Anlehnung an die Erkenntnisse aus den Expressionsmustern der anderen Untereinheiten des Komplexes ist davon auszugehen, dass sich bei Untersuchung des Expressionsmusters des BAP60-Proteins somit ebenfalls eine ubiquitäre Expression des Proteins in der gesamten Embryogenese mit einer leichten Anreicherung im ZNS ergeben würde. Es ist daher unwahrscheinlich, dass BAP60 eine Stadien- oder gewebsspezifische Untereinheit des Komplexes darstellt. Das Ergebnis ist vielmehr mit der Annahme vereinbar, dass BAP60 konstitutiver Bestandteil des Komplexes ist. Es sei angemerkt, dass die Anreicherung des Brahma-Komplexes im ZNS der späten Embryonen nicht unbedingt auf eine spezifische Funktion des Komplexes in diesem Gewebe hindeuten

muss. Das Nervensystem der Embryonen ist das letzte Gewebe, das während der späten Embryogenese noch stark proliferiert (Bate und Martinez Arias, 1993). Aufgrund der vitalen Bedeutung des Brahma-Komplexes ist es daher denkbar, dass die Expression seiner Komponenten an die Zellteilung gekoppelt ist.

Die Bedeutung der Untereinheiten BRM, MOR, SNR1 und OSA für die frühe Entwicklung von *Drosophila* konnte in der Vergangenheit bereits aufgrund spezifischer Mutationen in den entsprechenden Genen untersucht werden. Homozygote *brm*-Mutanten sterben als ungeschlüpfte Larven, ohne dass sie Defekte im Segmentierungsmuster aufweisen (Tamkun *et al.*, 1992). Solche Defekte wären aufgrund der Beteiligung von *brm* an der Regulierung homöotischer Gene zu erwarten gewesen. Das Fehlen von Segmentierungsdefekten wurde auf das Vorhandensein einer starken maternalen *brm*-Komponente im Embryo zurückgeführt. Beim Ausfall maternalen *brm*-Funktion kommt es jedoch zu einer Blockierung der Oogenese selbst, so dass die Rolle von *brm* in der frühen Embryogenese unklar blieb (Brizuela *et al.*, 1994). Homozygote *osa*-Mutanten sterben ebenfalls spät in der Embryonalentwicklung ohne klare Segmentierungsdefekte zu zeigen (Vázquez *et al.*, 1999). Bei maternalem Ausfall des Gens werden zwar Eier gelegt, allerdings entwickeln sich daraus keine Larven. Bei der MOR-Untereinheit führen homozygote Mutationen im Embryo zu Defekten in den Kopfstrukturen und den Mundhaken der larvalen Kutikula, aus Keimbahnklonen wiederum gehen fehlgebildete Eier hervor (Brizuela und Kennison, 1997). Im Falle der SNR1-Untereinheit bewirken homozygote Mutationen ein Absterben der Larven vor dem dritten Larvenstadium, bei maternalen Homozygotie werden keine Eier gelegt (Dingwall *et al.*, 1995).

Durch impräzise Exzision eines P-Element-Transposons am *Bap60*-Locus wurde eine Null-Mutante des *Bap60*-Gens generiert (*Bap60^l*; Abschnitt 2.2). Da sich das Gen auf dem X-Chromosom befindet, betrifft diese Null-Mutation alle männlichen Organismen, die das entsprechende Allel tragen. Männliche *Bap60^l*-Individuen sterben innerhalb der Eihülle oder als frühe Larven (siehe Abschnitt 2.3). Sie weisen weder Defekte im Segmentierungsmuster, noch abnormale Strukturen im Nervensystem oder in der Muskulatur auf. Damit ist der essenzielle Charakter von *Bap60* für die Lebensfähigkeit von *Drosophila* gezeigt. Auch führt der zygotische Ausfall von

Bap60 somit zu einem Phänotyp, der in seiner Ausprägung der Letalität homozygoter *brm*-Mutanten äquivalent ist.

Ein spätes Absterben während der embryonalen Phase, bzw. ein frühes Absterben in der larvalen Phase ohne Auftreten erklärender Entwicklungsdefekte scheint eine allgemeine Eigenschaft des Ausfalls solcher Gene zu sein, welche für Untereinheiten des Brahma-Komplexes codieren. Die Ähnlichkeit des mutanten *Bap60*-Phänotyps mit dem beobachteten mutanten Phänotyp anderer Gene des Brahma-Komplexes deutet darauf hin, dass BAP60 seine Funktion tatsächlich im Kontext des Brahma-Komplexes ausübt und zumindest für einige Funktionen des Komplexes essenziell ist. Hierfür spricht auch das Resultat, dass BAP60 als maternales Produkt, wie die anderen Untereinheiten des Komplexes auch, für eine korrekte Oogenese erforderlich ist. Bei *Caenorhabditis elegans* haben sich in RNAi-Versuchen für die BAP60-homologe Untereinheit ebenfalls Defekte ergeben, die dem Phänotyp von Mutationen der BRM- und MOR-Homologe, sowie den RNAi-Effekten des SNR1-Homologs ähneln (Sawa *et al.*, 2000). In allen diesen Fällen zeigten sich Abnormalitäten in der asymmetrischen Zellteilung oder ähnliche Defekte. Eine mögliche Funktion von BAP60 in der Regulation des Zellzyklus durch den Brahma-Komplex ist auch von *Drosophila* bekannt (Brumby *et al.*, 2002).

Der Grund für die beobachtete Letalität bei zygotischem Ausfall von Untereinheiten des Brahma-Komplexes mag in einer Beteiligung des Komplexes an basalen Zellfunktionen zu finden sein. Tatsächlich deutete eine Auswertung somatischer *snr1*-Zellklone auf eine Bedeutung des Brahma-Komplexes für die Zellviabilität hin (Zrally *et al.*, 2003). So waren *snr1*-Klone nicht nur kleiner als entsprechende Kontrollklone, sondern traten auch weniger häufig auf. Wahrscheinlich verhindert eine maternale Komponente in allen Fällen homo- bzw. hemizygoter Mutanten des Brahma-Komplexes das Auftreten starker Entwicklungsdefekte. Je nach Stärke und Langlebigkeit dieser maternalen Komponente wird wohl ein unterschiedlich langes Überleben der Mutanten ermöglicht.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass BAP60 eine wichtige Rolle in der Funktion des Brahma-Komplexes spielt, ergibt sich aus der Analyse transheterozygoter Fliegen. Gleichzeitige Heterozygotie für *Bap60^l* und für *brm²* oder *mor^l* führt im Vergleich zu einer alleinigen Heterozygotie für *brm²* oder *mor^l* zu einem verstärkten Fehlen

humeraler Makrochäten (siehe Abschnitt 2.4.1). Dieser Phänotyp verschiedener *brm*-Mutanten ähnelt Defekten im dorsalen Thorax, die sich bei fehlerhafter Funktion des *Antennapedia*-Promotors *P1* ergeben (Tamkun *et al.*, 1992; Abbott und Kaufman, 1986). Damit könnte BAP60 an der Brahma-Komplex-abhängigen Aktivierung von *Antp-P1* oder an der Regulation von ANTP-Zielgenen beteiligt sein.

Dass BAP60, wie andere Untereinheiten des Brahma-Komplexes auch, direkt an der Aktivierung von *Antp* beteiligt ist, ergab sich in der Folge aus der Analyse zweier *Antp*-Mutanten, die aufgrund ektopischer Expression von *Antp* in der Augen-Antennen-Imaginalscheibe eine teilweise Transformation der Antennen in Beine bewirken (siehe Abschnitt 2.4.2). Im Falle des *Antp^{NS}*-Allels liegt der Grund für die ektopische Expression in einer Derepression des *Antp*-Promotors *P2* in der Augen-Antennen-Imaginalscheibe, ausgelöst durch Insertionen des *roo*-Transposons (Jorgensen und Garber, 1987; Talbert und Garber, 1994). Beim *Antp^{73b}*-Allel hingegen wird die ektopische Expression von *Antp* durch eine Inversion ausgelöst, durch die der offene Leserahmen des *Antp*-Gens mit dem Promotor und dem 5'-Exon des *sas*-Gens fusioniert ist, welches natürlicherweise in der Augen-Antennen-Imaginalscheibe exprimiert wird (Frischer *et al.*, 1986; Schneuwly *et al.*, 1987).

Bap60^l ist in der Lage, bei Transheterozygotie die *Antp^{NS}*-abhängige Antennen-Transformation zu unterdrücken. Die *Antp^{73b}*-abhängige Transformation bleibt bei Transheterozygotie für *Bap60^l* jedoch unbeeinflusst. Die unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass BAP60 direkt an der Aktivierung von *Antp-P2* beteiligt ist. Läge der Grund der *Bap60^l*-abhängigen Supprimierung der Antennen-Transformation in einer fehlerhaften Regulation von ANTP-Zielgenen, so müsste sich die Supprimierung auch bei einer Transheterozygotie mit *Antp^{73b}* zeigen. Da Mutanten von *brm*, *mor*, *snr1* und *osa* die gleiche Fähigkeit zur Supprimierung von *Antp^{NS}* aufweisen (Tamkun *et al.*, 1992; Vázquez *et al.*, 1999; Brizuela und Kennison, 1997; Zrally *et al.*, 2003), ist es wahrscheinlich, dass BAP60 seine Funktion in der Aktivierung von *Antp-P2* im Rahmen des Brahma-Komplexes ausübt.

Das geringe Ausmaß der Supprimierung durch *Bap60^l* im Vergleich zu *mor^l* (siehe Tabelle 2-4) könnte auf ein höheres Expressionsniveau von BAP60 zurückgehen; alternativ könnte der Unterschied verschiedene Aufgaben der Untereinheiten innerhalb des Komplexes widerspiegeln. Tatsächlich könnte BAP60 in der Aktivierung einiger Gene, die auf den Brahma-Komplex angewiesen sind, eine nur

periphere Rolle spielen. So zeigten Versuche in der Hefe, dass einige Transkriptionsfaktoren, die für ihr Transaktivierungspotenzial auf den SWI/SNF-Komplex angewiesen sind, auch dann zur Transkriptionsaktivierung fähig waren, wenn den Zellen das BAP60-Homolog des SWI/SNF-Komplexes fehlte (Cairns *et al.*, 1996b).

4.2 BAP60 als Modulator der Positionseffekt-Variegation

Wenn aufgrund von chromosomalen Umordnungen ein euchromatisches Gen in die Nachbarschaft heterochromatischer Strukturen gelangt, kann es zum Auftreten der so genannten Positionseffekt-Variegation (PEV) kommen. Dieses Phänomen zeigt sich in einer zellautonomen Abschaltung („Silencing“) des translozierten Gens, so dass dieses in einigen Zellen aktiv, in anderen dagegen reprimiert ist. Die Ursache für diese differenzielle Abschaltung translozierter Gene wird allgemein in einer vom chromosomalen Bruchpunkt ausgehenden Ausbreitung heterochromatischer Strukturen in *cis* gesehen (Tartof *et al.*, 1984). Dabei breitet sich das Heterochromatin von Zelle zu Zelle unterschiedlich weit in den ursprünglich euchromatischen Bereich hinein aus. Diesem Modell der linearen Ausbreitung heterochromatischer Strukturen widersprechen jedoch verschiedene Beobachtungen, die z. B. eine Diskontinuität der PEV zeigen (Talbert und Henikoff, 2000).

Ein alternatives Modell erklärt die PEV durch die Lokalisierung heterochromatischer Chromatindomänen in Kernkompartimenten, die einer Transkriptionsaktivierung entgegenwirken (Übersichtsartikel von Wakimoto, 1998). Ein solches Modell kann auch eher die Variegation von Genen erklären, die mehrere Millionen Basen vom Bruchpunkt entfernt liegen (Weiler und Wakimoto, 1995). Unabhängig von den Grundlagen der Variegation wird die Ursache für die Abschaltung der translozierten Gene jedoch in einer veränderten Chromatin-Struktur gesehen. So kommt es bei einer Reduktion der Kopienzahl von Histon-Genen zu einer Verringerung des negativen Einflusses von Positionseffekten auf die Genaktivität (Moore *et al.*, 1983). Ferner führt auch eine chemisch herbeigeführte Hyperacetylierung der Histone zu einer Unterdrückung negativer Positionseffekte (Mottus *et al.*, 1980).

Proteine, die allgemein an der PEV beteiligt sind, lassen sich über die Veränderungen an der PEV identifizieren, welche bei Mutation der entsprechenden Gene zu beobachten sind. Bisher sind circa 120 Gene identifiziert worden, die in ihrer

mutierten Form zu einer Verstärkung oder Verminderung der PEV-beeinflussten Genaktivität führen (Übersichtsartikel von Wakimoto, 1998). Darunter befinden sich z.B. auch die Gene der Proteine HP1 und SU(VAR)3-9, von denen bekannt ist, dass sie an der Ausbildung und Aufrechterhaltung heterochromatischer Strukturen unmittelbar beteiligt sind (James und Elgin, 1986; Tschiersch *et al.*, 1994; Rea *et al.*, 2000; Lachner *et al.*, 2001).

Aufgrund der weit ausgedehnten Verteilung von SNR1 und BRM an polytären Chromosomen wurden in einer Arbeit, die sich mit der Charakterisierung von SNR1 beschäftigte, die Auswirkungen der Brahma-Komplex-Untereinheiten auf die PEV untersucht (Zrally *et al.*, 2003). Dabei wurde ein Inversionschromosom verwendet, in dem der *white*-Locus in die Nachbarschaft centromerischen Heterochromatins transloziert ist (*In(1)w^{m4h}*; Reuter und Wolff, 1981). Das *white*-Gen codiert für ein Membranprotein, das für den Import von Vorläufern der Augenpigmentsynthese verantwortlich ist (Tearle *et al.*, 1989; Mackenzie *et al.*, 1999). Durch die differenzielle Abschaltung des *white*-Gens in den Ommatidien des *Drosophila*-Auges kommt es zu einer variierten Augenfarbe. Verschiedene *snr1*-Mutanten zeigten eine Supprimierung dieses Augenphänotyps, während Mutationen in *brm*, *mor* oder *osa* zu keinen klaren Veränderungen in der PEV führten (Zrally *et al.*, 2003). Wie in Abschnitt 2.4.3 dargestellt ist auch *Bap60^l* in der Lage, bei Heterozygotie eine Supprimierung der *In(1)w^{m4h}*-abhängigen *white*-Variegation herbeizuführen. Dies zeigt sich im Auftreten einer normalen, roten Ommatidienfarbe im gesamten Auge. Der partielle Ausfall von BAP60 führt somit zu einer Beeinträchtigung der Heterochromatin-vermittelten Gen-Abschaltung. Gleiches gilt für SNR1. Dies impliziert, dass beide Proteine an diesem Prozess direkt oder indirekt beteiligt sind.

Eine mögliche Beteiligung des Brahma-Komplexes und von SWI/SNF-artigen Komplexen allgemein an Prozessen der Genrepression ist bereits in der Einleitung erwähnt worden. Die Tatsache, dass neben BAP60 und SNR1 keine andere Untereinheit eine Auswirkung auf die PEV zeigt, lässt sich durch eine unmittelbare Vermittlung der repressiven Funktion des Komplexes durch BAP60 und SNR1 erklären. Denkbare Rollen von BAP60 und SNR1 in diesem Zusammenhang könnten in einer Rekrutierung des Komplexes zwecks remodelierungsabhängiger Repression liegen. Alternativ könnten beide Proteine in negativer Weise modulierend auf den

Komplex einwirken und dadurch eine remodellierungsabhängige Auflockerung der Chromatin-Struktur verhindern.

Ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung des Brahma-Komplexes an der Ausbildung oder Aufrechterhaltung heterochromatischer Strukturen ergibt sich aus der Beobachtung, dass das humane BRM-Homolog BRG1 mit dem heterochromatischen Protein HP1 α interagiert (Nielsen *et al.*, 2002). Es gibt jedoch auch ein Anzeichen für eine negative Modulation der Komplexaktivität durch BAP60-Homologe. Ein einzelner Aminosäureaustausch im Glucocorticoid-Rezeptor bewirkt einen Verlust seiner Interaktion mit BAF60a, beeinträchtigt aber die Assoziierung des Rezeptors mit dem BRG1-Komplex nicht. Interessanterweise ist die Remodellierungsaktivität des Komplexes jedoch verringert (Hsiao *et al.*, 2003). Die Interaktion von BAF60a mit dem Rezeptor könnte daher für die Aufhebung eines negativen Effektes von BAF60a auf die Remodellierungsaktivität erforderlich sein.

4.3 DNA-Bindung durch BAP60 *in vitro* und seine Assoziation mit Chromatin *in vivo*

Die Art und Weise, wie SWI/SNF-artige Komplexe mit ihrem Chromatin-Substrat wechselwirken, stellt einen unverstandenen Aspekt ihrer Eigenschaften dar. So zeigt der SWI/SNF-Komplex der Hefe zwar keine sequenzspezifische DNA-Bindung, aber dennoch eine gewisse Präferenz in seinen DNA-Bindungseigenschaften. Dies zeigt sich anhand der Abschirmung bestimmter Sequenzbereiche in DNA-Footprint-Experimenten. Darüber hinaus besitzt der Komplex die Eigenschaft zur spezifischen Bindung an synthetisch erzeugte kruziforme DNA (Quinn *et al.*, 1996). Die Struktur, die durch diese DNA gebildet wird, ähnelt der Struktur der nukleosomalen DNA am Punkt ihres nukleosomalen Ein- und Austritts (Lilley, 1992).

Verschiedene Untereinheiten SWI/SNF-artiger Komplexe weisen Motive auf, die an der Interaktion der Komplexe mit ihren nukleosomalen Zielstrukturen beteiligt sein könnten. So enthalten etwa die verwandten Proteine BAP111 (*Drosophila*) und BAF57 (Mensch) eine HMG-Domäne. Die Deletion dieser Domäne in BAP111 führt in genetischen Versuchen zu einem Verlust der Proteinfunktion *in vivo* (Papoulas *et al.*, 2001). Bei Fehlen der Domäne in BAF57 zeigen sich Defekte in BAF57-abhängigen Regulationsprozessen (Chi *et al.*, 2002). Einschränkend ist zu erwähnen,

dass Antikörperfärbungen gegen BAP111 keine Assoziation des Proteins mit polytären Chromosomen zeigen konnten (Papoulas *et al.*, 2001) und dass humane BRG1/hBRM-Komplexe auch ohne die HMG-Domäne von BAF57 DNA-Bindung zeigten (Wang *et al.*, 1998). Darüber hinaus findet sich in den SWI/SNF- und RSC-Komplexen der Hefe kein Homolog dieser Proteine. Die HMG-Domäne dieser Untereinheiten kann daher keinen generellen Faktor in der Interaktion der Komplexe mit ihrem Substrat darstellen. Gleiches gilt für andere DNA-Bindungsmotive, die sich in nichtkonservierten Untereinheiten befinden, wie dies z. B. bei der ARID-Domäne in Rsc9 (Wilsker *et al.*, 2002), den Zinkfinger-Motiven in Rsc3 und Rsc30 (Angus-Hill *et al.*, 2001) und dem AT-Hook-Motiv in Rsc1 und Rsc2 (Cairns *et al.*, 1999) der Fall ist.

Das *Drosophila*-Protein OSA weist ebenfalls eine ARID-Domäne auf und wird als Ortholog der SWI/SNF-Untereinheit Swi1 und der humanen Untereinheit BAF250 angesehen (Vázquez *et al.*, 1998). OSA bindet DNA in sequenzunspezifischer Weise und kolokalisiert in Antikörperfärbungen an polytären Chromosomen mit endogenem BRM. Allerdings ist die Lokalisation von BRM entlang der Chromosomen in *osa*-Mutanten nicht gestört (Collins *et al.*, 1999). Mit dieser Beobachtung und mit der Tatsache, dass OSA nicht in allen Aufreinigungen des Brahma-Komplexes auftritt und auch ein Ortholog im RSC-Komplex der Hefe fehlt, ist eine grundsätzliche Bedeutung dieses Proteins für die Interaktion des Komplexes mit seinem Substrat ebenfalls fraglich. Unter den Untereinheiten, welche in allen SWI/SNF-artigen Komplexen auftreten, findet sich im hBRM-Protein ein AT-Hook-Motiv, das *in vitro* eine unspezifische DNA-Bindung vermittelt (Bourachot *et al.*, 1999). Dieses Motiv ist allerdings in den katalytischen Untereinheiten anderer Komplexe nicht konserviert.

In BRM, MOR und ihren Homologen finden sich konservierte Motive, die zwar keine DNA-Bindung vermitteln, wohl aber an der Interaktion mit dem nukleosomalen Substrat beteiligt sein könnten. Dies ist die Bromodomäne in BRM und seinen Homologen und die SANT-Domäne der MOR-Homologe. Bromodomänen dienen der spezifischen Wechselwirkung mit acetylierten Histon-Schwänzen (Owen *et al.*, 2000; Jacobson *et al.*, 2000; Dhalluin *et al.*, 1999). Ihre Rolle innerhalb SWI/SNF-artiger Komplexe ist allerdings nicht eindeutig. Sowohl die Bromodomäne von Swi2/Snf2 wie auch acetylierte Histone sind zwar für eine stabile Assoziation des SWI/SNF-Komplexes *in vitro* erforderlich (Hassan *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2002), jedoch

bleibt die Assoziierung von BRM mit polytären Chromosomen von einer Deletion der Bromodomäne unbeeinflusst (Armstrong *et al.*, 2002). SANT-Domänen scheinen ebenfalls bei Interaktionen mit Histonen eine Rolle zu spielen (Boyer *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2003).

Was ist die Relevanz der vielfältigen Möglichkeiten zur DNA-Bindung und Nukleosomen-Assoziierung, die sich durch die in den vorangegangenen Absätzen dargestellten Motive ergeben? Die Fähigkeit der katalytischen Untereinheit SWI/SNF-artiger Komplexe, für sich bereits als DNA-abhängige ATPase zu wirken, zeigt, dass sie allein schon DNA-Bindungseigenschaften besitzen muss (Laurent *et al.*, 1993). Da ferner ein minimaler Komplex aus den humanen BRM-, SNR1- und MOR-Homologen *in vitro* bereits die volle Aktivität zeigt (Phelan *et al.*, 1999), muss er bereits alle nötigen Eigenschaften für eine Wechselwirkung mit seinem Substrat besitzen. Die anderen DNA-bindenden Untereinheiten SWI/SNF-artiger Komplexe mögen daher für spezifische Aspekte der Aktivität *in vivo*, also im Kontext des natürlichen Substrats dieser Komplexe, eine Rolle spielen. Dieser Kontext könnte für jeden der vielen SWI/SNF-artigen Komplexe je nach Organismus, je nach Struktur der zu remodellierenden Gen-Loci und je nach Art der erforderlichen Remodelierungsaktivität unterschiedlich sein.

Das vorgestellte Bild der DNA-Bindungseigenschaften SWI/SNF-artiger Komplexe wird durch die in dieser Arbeit identifizierte direkte DNA-Bindung durch BAP60 noch komplizierter. Wie in Abschnitt 2.5 dargestellt geht diese Bindung auf einen Bereich innerhalb des Proteins zurück, dessen Sequenz in BAP60-homologen Proteinen verschiedenster Organismen konserviert ist. Dies trifft selbst auf die homologen Proteine verschiedener Pflanzen zu (siehe Abb. 2-12). Gleichzeitig ist die identifizierte DNA-Bindungsdomäne auf die Familie der BAP60-Orthologe beschränkt. Beide Punkte stellen einen bemerkenswerten Umstand dar. Würde die Zielstruktur der DNA-Bindungsdomäne allein in gewöhnlicher, linearer DNA bestehen, so wäre nicht ersichtlich, warum das gleiche DNA-Bindungsmotiv nicht auch von anderen Proteinen verwendet wird, die – in anderem Zusammenhang wirkend – über DNA-Bindung verfügen müssen. Die Konservierung der Domäne und ihre Beschränkung auf die Familie der BAP60-Orthologe deuten daher auf eine hochspezialisierte und wichtige Funktion der Domäne hin, die wohl nur im Kontext der Chromatin-Remodellierung durch SWI/SNF-artige Komplexe einen Sinn macht.

Auf eine hochspezialisierte Funktion der Domäne könnte auch das Ergebnis hinweisen, dass dieselben Mutationen, welche die DNA-Bindung *in vitro* beeinträchtigen, *in vivo* keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Domäne zur Assoziation mit Chromatin haben und auch die Funktion des Volllängen-Proteins *in vivo* nicht negativ beeinflussen. Die wahren Zielstrukturen der DNA-Bindungsdomäne könnten sich von der einfachen DNA unterscheiden, wie sie im *In-vitro*-Bindungsversuch verwendet wurde und in höheren Ordnungsformen der DNA liegen, die spezifisch für das Substrat SWI/SNF-artiger Komplexe sind.

Alternativ könnte die DNA-Bindung der Domäne *in vivo* durch gleichzeitige Interaktion der Domäne mit Proteinen des Chromatins stabilisiert sein. Auch ist denkbar, dass solche Protein-Wechselwirkungen die eigentliche Aufgabe der Domäne darstellen und dass die *in vitro* beobachtete DNA-Bindung eine rein akzessorische, nicht-essenzielle Rolle spielt.

So unklar wie die Zielstrukturen der DNA-Bindungsdomäne muss vorerst auch ihre Funktion für den Komplex bleiben. Der sequenzunspezifische Charakter der DNA-Bindung (Abschnitt 2.5.4) spricht gegen eine direkte Rolle der Domäne in der Rekrutierung des Komplexes an spezifische Gen-Loci. Gegen eine solche Rolle spricht auch die gleichmäßige Verteilung der Domäne entlang der polytären Chromosomen (Abb. 2-18). Es ist jedoch denkbar, dass die Domäne die Rekrutierung des Komplexes durch sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren unterstützt, zum Beispiel durch Stabilisierung der Komplex-Assoziation mit dem Ziel-Locus nach erfolgter Rekrutierung. Die Funktion der Domäne könnte aber auch in einer Erhöhung der Prozessivität des Komplexes liegen oder in einer Modulierung der Remodellierungsaktivität durch Interaktion mit dem nukleosomalen Substrat.

4.4 Die Beteiligung von BAP60 an der Aktivierung von *Sxl-Pe*

Frühe Vorstellungen von der Funktionsweise Chromatin-remodellierender Komplexe des SWI/SNF-Typs gingen davon aus, dass diese Komplexe ungerichtet im gesamten Genom zu vorübergehenden Veränderungen der Chromatin-Struktur führen, die dann durch anschließendes Binden eines spezifischen Aktivators stabilisiert werden (Owen-Hughes *et al.*, 1996). Für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wurde jedoch gezeigt, dass eine solche transiente Remodellierung nicht ausreicht um zu einer

Transkriptionsaktivierung zu führen (Kadam *et al.*, 2000; Kal *et al.*, 2000; Mayall *et al.*, 1997; Sheridan *et al.*, 1995). Dagegen sind in den letzten Jahren viele Beispiele direkter Wechselwirkungen SWI/SNF-artiger Komplexe mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren aufgezeigt worden. Überdies wurde nachgewiesen, dass solche Wechselwirkungen zu ortsspezifischer Remodellierung und nachfolgender Transkriptionsaktivierung führen. Der *Drosophila*-Transkriptionsfaktor Zeste ist zum Beispiel in der Lage, im Chromatin-Kontext auch ohne vorherige Remodellierung an seine Bindungsstellen zu binden. Zeste benötigt für die Aktivierung jedoch die remodellierende Aktivität des Brahma-Komplexes und interagiert auch direkt mit einigen Untereinheiten des Komplexes (Kal *et al.*, 2000). Ferner ist für die Rekrutierung des SWI/SNF-Komplexes an den *HO*-Promotor der Hefe die vorherige Bindung des Transkriptionsfaktors Swi5p erforderlich. Die SWI/SNF-abhängige Remodellierung des Chromatins im Promotor-Bereich ist dann wiederum Voraussetzung für die weiteren Aktivierungsschritte (Cosma *et al.*, 1999).

Für eine ganze Reihe unterschiedlicher Untereinheiten SWI/SNF-artiger Komplexe sind Interaktionen mit sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren gezeigt worden. So bindet zum Beispiel der oben erwähnte Transkriptionsfaktor Zeste an die Brahma-Untereinheiten MOR und OSA (Kal *et al.*, 2000). Auch interagieren die Snf5-, Swi1- und Swi2/Snf2-Untereinheiten des SWI/SNF-Komplexes mit den Aktivatorproteinen Gcn4 und Hap4 und mit den sauren Aktivierungsdomänen dieser Proteine (Neely *et al.*, 2002). Ferner zeigt die humane BAF57-Untereinheit direkte Wechselwirkungen mit dem Östrogen-Rezeptor und dem CoREST-Repressor (Belandia *et al.*, 2002; Battaglioli *et al.*, 2002) sowie mit dem Glucocorticoid-Rezeptor (Hsiao *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist ein minimaler Komplex aus den humanen Untereinheiten BRG1 und BAF155 in der Lage, funktionell mit dem Transkriptionsfaktor EKLF zu interagieren (Kadam *et al.*, 2000). Dies impliziert, dass mindestens eine dieser Untereinheiten mit EKLF direkt wechselwirkt. Es ist denkbar, dass all diese Interaktionen an der Rekrutierung Chromatin-remodellierender Komplexe beteiligt sind.

Für die Familie der BAP60-homologen Untereinheiten sind bisher die meisten direkten Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren dokumentiert. So bindet humanes BAF60a spezifisch das AP-1-Heterodimer cJun/cFos (Ito *et al.*, 2001), den Glucocorticoid-Rezeptor und weitere Kernrezeptoren (Hsiao *et al.*, 2003). Die Interaktion zwischen BAP60-Homologen und dem Glucocorticoid-Rezeptor ist

Voraussetzung für das Aktivierungspotenzial des Rezeptors sowohl in Hefe wie auch in Zellkultur-Experimenten (Cairns *et al.*, 1996b; Hsiao *et al.*, 2003). Auch wurde gezeigt, dass BAF60a mit dem Heterodimer-Komplex des Vitamin-D-Rezeptors und seiner RXR-Komponente interagiert und das Transaktivierungspotenzial dieses Heterodimers in Zellkultur-Experimenten beeinflusst (Koszewski *et al.*, 2003). Eine weitere Studie (Debril *et al.*, 2004) belegte eine *In-vitro*-Interaktion des humanen BAF60c-Proteins sowohl mit Kernrezeptoren (PPAR γ , ER α und FXR) als auch mit verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren, darunter Faktoren des Helix-Loop-Helix- (SREBP1a), des bZIP- (cJun) und des Homöobox-Typs (PBX1).

Für das *Drosophila*-Protein BAP60 waren bislang keine direkten Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren bekannt. Mit der in Abschnitt 2.6 dargestellten genetischen und physischen Interaktion zwischen BAP60 und den Transkriptionsfaktoren SISA und SC liegt ein erster Hinweis dafür vor, dass Wechselwirkungen dieser Untereinheit mit Transkriptionsfaktoren auch in *Drosophila* eine wichtige Rolle in der Komplex-Rekrutierung einnehmen. Es ist zudem ein Nachweis für die Bedeutung solcher Wechselwirkungen für die Genregulation *in vivo*.

Die vorgestellten Daten deuten darauf hin, dass BAP60 über direkte Interaktion mit den sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren SISA und SC an der Aktivierung des frühen Promotors von *Sex-lethal* (*Sxl-Pe*) beteiligt ist. Bei Reduktion der vorhandenen Proteinmengen dieser Faktoren kommt es in weiblichen Embryonen zu einer verringerten oder gar vollständig fehlenden Aktivierung von *Sxl-Pe*. Dadurch wird nicht genügend SXL-Protein gebildet um die Dosiskompensation effektiv zu unterdrücken (vergleiche Abschnitt 1.5), was schließlich aufgrund einer Überexpression X-chromosomaler Gene den Tod der Embryonen zur Folge hat.

Die Beteiligung von BAP60 an der Aktivierung von *Sxl-Pe* weist auch darauf hin, dass die Remodellierung der Chromatin-Struktur an diesem Promotor Teil des Aktivierungsprozesses ist. Die Rekrutierung des Brahma-Komplexes über die Numerator-Proteine SISA und SC eröffnet die Möglichkeit, dass der Brahma-Komplex an der Interpretation der X-chromosomalen Dosis im Embryo einen Anteil hat. Es kann sogar spekuliert werden, dass eine Rekrutierung des Brahma-Komplexes bei entsprechender Besetzung der Numeratur-Bindungsstellen von *Sxl-Pe* den entscheidenden ersten Schritt hin zur Aktivierung des Gens darstellt.

Diese Befunde und die Beobachtung, dass BAP60-Homologe mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagieren, sind mit der Annahme vereinbar, dass eine wichtige Funktion BAP60-homologer Proteine in der Interaktion mit sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren zu finden ist. Es ist aber unwahrscheinlich, dass dies die alleinige Funktion oder auch nur die Hauptfunktion von BAP60 ist. Vielmehr scheint es, als ob im Prinzip alle Untereinheiten des Komplexes für die Rekrutierung des Komplexes eingespannt werden können. So sind, wie erwähnt, auch für die Untereinheiten des BRM-, MOR-, SNR1- und BAP111-Typs Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren bekannt. Die beobachtete Fähigkeit von BAP60, direkt mit DNA zu interagieren, könnte ebenfalls im Kontext der Komplex-Rekrutierung eine Rolle spielen. Dies würde erklären, warum die Anwesenheit von BAP60a in einer Bindungsreaktion des cJun/cFos-Heterodimers und seiner AP-1-Bindungsstelle eine stärkere DNA-Bindung bewirkt (Ito *et al.*, 2001).

4.5 Schlussbemerkungen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz der BAP60-Untereinheit für die Funktion des Brahma-Komplexes *in vivo* untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass BAP60 eine wichtige Untereinheit des Komplexes darstellt und dem funktionellen Kern des Komplexes zuzuordnen ist. Der durch Ausfall der maternalen bzw. zygotischen *Bap60*-Genfunktion resultierende Phänotyp verdeutlicht, dass BAP60 zumindest für einige Funktionen des Komplexes essenziell ist. Die vorgestellten Ergebnisse geben darüber hinaus Aufschluss über spezifische Funktionen von BAP60:

(1) BAP60 vermittelt repressive Funktionen des Komplexes. Dies konnte anhand von Heterochromatin-abhängigen Silencing-Effekten bei der Positionseffekt-Variegation gezeigt werden. Es bleibt unklar, ob diese Funktion auf einer modulatorischen Wirkung von BAP60 oder auf einer BAP60-abhängigen Rekrutierung des Komplexes beruht.

(2) BAP60 spielt in der Rekrutierung des Komplexes an spezifische Gen-Loci eine Rolle. Dieser Punkt wurde bereits durch Studien nahegelegt, die sich mit den

humanen BAP60-Homologen beschäftigten, konnte nun im Zusammenhang der Aktivierung des frühen *Sxl*-Promotors jedoch erstmals *in vivo* bestätigt werden.

(3) BAP60 ist an der Interaktion des Komplexes mit Chromatin beteiligt. Eine Domäne innerhalb des BAP60-Proteins vermittelt sowohl DNA-Bindung *in vitro* wie auch Chromatin-Assoziation *in vivo*. Die funktionelle Bedeutung dieser zusätzlichen Interaktions-Schnittstelle mit dem Chromatin-Substrat bleibt jedoch unklar.

Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen war die Diskrepanz zwischen dem hohen Konservierungsgrad der BAP60-Untereinheit einerseits und der Tatsache, dass die BAP60-Untereinheit andererseits für die Chromatin-remodellierende Aktivität des Komplexes *in vitro* nicht erforderlich ist. Gemäß der hier vorgestellten Ergebnisse ist eine solche Diskrepanz *in vivo* nicht gegeben. Dies verdeutlicht, dass die Versuchsbedingungen, die bei der Messung der Komplexaktivität *in vitro* Verwendung fanden (Phelan *et al.*, 1999), nicht das natürliche Chromatin-Substrat des Komplexes widerspiegeln. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass eine Notwendigkeit für BAP60 nur im Kontext bestimmter Chromatin-Strukturen gegeben ist und sie daher nicht für alle Aktivitäten des Brahma-Komplexes gilt.

Die Strukturen des Chromatins sind nur sehr lückenhaft bekannt. Daher muss es vorerst unmöglich bleiben, die Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren *in vitro* vollständig nachzustellen. Die Aufklärung der nukleosomalen Struktur hat ihre Einbeziehung in unsere Vorstellungen von den Mechanismen der Genregulation ermöglicht und diese Vorstellungen grundlegend verändert. Es ist zu erwarten, dass die Kenntnis höherer Ebenen der Chromatin-Struktur ähnliche Folgen für unser Verständnis der Genregulation haben wird.

5. Zusammenfassung

Die Verpackung der nukleären DNA eukaryotischer Organismen in nukleosomalen Strukturen macht Mechanismen erforderlich, welche die Zugänglichkeit der genomischen Information gewährleisten. Verschiedene Chromatin-remodellierende Aktivitäten sind an der Veränderung der Chromatin-Struktur auf nukleosomaler Ebene beteiligt. Dazu zählen Protein-Komplexe, die unter Aufwendung von ATP die Zugänglichkeit nukleosomaler DNA erhöhen können.

Der Brahma-Komplex von *Drosophila melanogaster* gehört der Gruppe ATP-abhängiger Chromatin-remodellierender Komplexe des SWI/SNF-Typs an. Er spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Fliege und in der Kontrolle des Zellzyklus. Außer der katalytischen Untereinheit BRM sind drei weitere Untereinheiten in allen homologen Komplexen eukaryotischer Organismen hochkonserviert: MOR, SNR1 und BAP60. Die BAP60-Untereinheit ist für die Remodellierungsaktivität des Komplexes *in vitro* jedoch nicht erforderlich. Die Charakterisierung ihrer Funktion *in vivo* war Gegenstand dieser Arbeit.

Ausgangspunkt der Studien war eine BAP60-Nullmutante, die durch ungenaue Exzision eines P-Element-Transposons am *Bap60*-Locus erzeugt wurde. Die Analyse des resultierenden Phänotyps belegt den essenziellen Charakter der BAP60-Untereinheit für die Funktion des Komplexes *in vivo*. Der zygotische bzw. maternale Ausfall der *Bap60*-Genfunktion führt zu einem Phänotyp, der in seiner Ausprägung dem Phänotyp von *brm*-Mutanten äquivalent ist. Damit ist BAP60 dem funktionellen Kern des Komplexes zuzuordnen. Genetische Untersuchungen zeigten überdies eine Bedeutung von BAP60 für die Brahma-Komplex-abhängige Aktivierung des *Antennapedia*-Gens und für den Aufbau heterochromatischer Strukturen. Zusätzlich deuten genetische und physische Interaktionen zwischen BAP60 und den Transkriptionsfaktoren SISA und SC auf eine Beteiligung von BAP60 an der Rekrutierung des Brahma-Komplexes an spezifische Gen-Loci hin. Ferner wurde innerhalb des BAP60-Proteins eine Domäne identifiziert, die *in vivo* mit Chromatin assoziiert und *in vitro* sequenzunspezifische DNA-Bindung zeigt. Sie gehört keiner bekannten Familie von DNA-Bindungsmotiven an und ist in allen BAP60-orthologen Proteinen konserviert. Ihre funktionelle Bedeutung bleibt jedoch unklar.

6. Literatur

Aalfs, JD und Kingston, RE. 2000. What does 'chromatin remodeling' mean? *Trends Biochem Sci* 25:548-555.

Abbott, MK und Kaufman, TC. 1986. The relationship between the functional complexity and the molecular organization of the Antennapedia locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 114:919-942.

Adams, MD et al. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.

Agalioti, T, Lomvardas, S, Parekh, B, Yie, J, Maniatis, T und Thanos, D. 2000. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103:667-678.

Almer, A und Horz, W. 1986. Nuclease hypersensitive regions with adjacent positioned nucleosomes mark the gene boundaries of the PHO5/PHO3 locus in yeast. *Embo J* 5:2681-2687.

Altschul, SF, Madden, TL, Schaffer, AA, Zhang, J, Zhang, Z, Miller, W und Lipman, DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

Angus-Hill, ML, Schlichter, A, Roberts, D, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P und Cairns, BR. 2001. A Rsc3/Rsc30 zinc cluster dimer reveals novel roles for the chromatin remodeler RSC in gene expression and cell cycle control. *Mol Cell* 7:741-751.

Armstrong, JA, Papoulas, O, Daubresse, G, Sperling, AS, Lis, JT, Scott, MP und Tamkun, JW. 2002. The *Drosophila* BRM complex facilitates global transcription by RNA polymerase II. *Embo J* 21:5245-5254.

Ashburner, M. 1989. *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. Two Volumes. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Bailey, TL und Elkan, C. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2:28-36.

Barbash, DA und Cline, TW. 1995. Genetic and molecular analysis of the autosomal component of the primary sex determination signal of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 141:1451-1471.

Bate, M und Martinez Arias, A. 1993. The Development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Battaglioli, E, Andres, ME, Rose, DW, Chenoweth, JG, Rosenfeld, MG, Anderson, ME und Mandel, G. 2002. REST repression of neuronal genes requires components of the hSWI.SNF complex. *J Biol Chem* 277:41038-41045.

Bednar, J, Horowitz, RA, Grigoryev, SA, Carruthers, LM, Hansen, JC, Koster, AJ und Woodcock, CL. 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14173-14178.

Belandia, B, Orford, RL, Hurst, HC und Parker, MG. 2002. Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *Embo J* 21:4094-4103.

Bell, LR, Maine, EM, Schedl, P und Cline, TW. 1988. Sex-lethal, a Drosophila sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* 55:1037-1046.

Bell, LR, Horabin, JI, Schedl, P und Cline, TW. 1991. Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in Drosophila. *Cell* 65:229-239.

Blanton, J, Gaszner, M und Schedl, P. 2003. Protein:protein interactions and the pairing of boundary elements in vivo. *Genes Dev* 17:664-675.

Bourachot, B, Yaniv, M und Muchardt, C. 1999. The activity of mammalian brm/SNF2alpha is dependent on a high-mobility-group protein I/Y-like DNA binding domain. *Mol Cell Biol* 19:3931-3939.

Boyer, LA, Langer, MR, Crowley, KA, Tan, S, Denu, JM und Peterson, CL. 2002. Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Mol Cell* 10:935-942.

Brand, AH und Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.

Bridges, CB. 1925. Sex in relation to chromosomes and genes. *Amer Naturalist* 59:127-137.

Brizuela, BJ, Elfring, L, Ballard, J, Tamkun, JW und Kennison, JA. 1994. Genetic analysis of the brahma gene of *Drosophila melanogaster* and polytene chromosome subdivisions 72AB. *Genetics* 137:803-813.

Brizuela, BJ und Kennison, JA. 1997. The *Drosophila* homeotic gene *moira* regulates expression of engrailed and HOM genes in imaginal tissues. *Mech Dev* 65:209-220.

Brumby, AM, Zrally, CB, Horsfield, JA, Secombe, J, Saint, R, Dingwall, AK und Richardson, H. 2002. *Drosophila* cyclin E interacts with components of the Brahma complex. *Embo J* 21:3377-3389.

Byrd, K und Corces, VG. 2003. Visualization of chromatin domains created by the gypsy insulator of *Drosophila*. *J Cell Biol* 162:565-574.

Cairns, BR, Kim, YJ, Sayre, MH, Laurent, BC und Kornberg, RD. 1994. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1950-1954.

Cairns, BR, Lorch, Y, Li, Y, Zhang, M, Lacomis, L, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Du, J, Laurent, B und Kornberg, RD. 1996a. RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell* 87:1249-1260.

Cairns, BR, Levinson, RS, Yamamoto, KR und Kornberg, RD. 1996b. Essential role of Swp73p in the function of yeast Swi/Snf complex. *Genes Dev* 10:2131-2144.

Cairns, BR, Schlichter, A, Erdjument-Bromage, H, Tempst, P, Kornberg, RD und Winston, F. 1999. Two functionally distinct forms of the RSC nucleosome-remodeling complex, containing essential AT hook, BAH, and bromodomains. *Mol Cell* 4:715-723.

Campos-Ortega, JA und Hartenstein, V. 1997. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag, Berlin.

Cherbas, L, Hu, X, Zhimulev, I, Belyaeva, E und Cherbas, P. 2003. EcR isoforms in *Drosophila*: testing tissue-specific requirements by targeted blockade and rescue. *Development* 130:271-284.

Chi, TH, Wan, M, Zhao, K, Taniuchi, I, Chen, L, Littman, DR und Crabtree, GR. 2002. Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature* 418:195-199.

Chi, TH, Wan, M, Zhao, K, Taniuchi, I, Chen, L, Littman, DR und Crabtree, GR. 2002. Reciprocal regulation of CD4/CD8 expression by SWI/SNF-like BAF complexes. *Nature* 418:195-199.

Chou, TB und Perrimon, N. 1992. Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 131:643-653.

Chou, TB und Perrimon, N. 1996. The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144:1673-1679.

Chung, YT und Keller, EB. 1990. Regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C proximal promoter. *Mol Cell Biol* 10:206-216.

Cline, TW. 1988. Evidence that sisterless-a and sisterless-b are two of several discrete "numerator elements" of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch Sxl between two alternative stable expression states. *Genetics* 119:829-862.

Collins, RT, Furukawa, T, Tanese, N und Treisman, JE. 1999. Osa associates with the Brahma chromatin remodeling complex and promotes the activation of some target genes. *Embo J* 18:7029-7040.

Collins, RT und Treisman, JE. 2000. Osa-containing Brahma chromatin remodeling complexes are required for the repression of wingless target genes. *Genes Dev* 14:3140-3152.

Coschigano, KT und Wensink, PC. 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female doublesex proteins of *Drosophila*. *Genes Dev* 7:42-54.

Cosma, MP, Tanaka, T und Nasmyth, K. 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* 97:299-311.

Cosma, MP. 2002. Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10:227-236.

Cote, J, Quinn, J, Workman, JL und Peterson, CL. 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* 265:53-60.

Crick, FHC. 1958. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* 12:138-163.

Cronmiller, C, Schedl, P und Cline, TW. 1988. Molecular characterization of daughterless, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. *Genes Dev* 2:1666-1676.

Crosby, MA, Miller, C, Alon, T, Watson, KL, Verrijzer, CP, Goldman-Levi, R und Zak, NB. 1999. The trithorax group gene *moira* encodes a brahma-associated putative chromatin-remodeling factor in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 19:1159-1170.

Debril, MB, Gelman, L, Fayard, E, Annicotte, JS, Rocchi, S und Auwerx, J. 2004. Transcription factors and nuclear receptors interact with the SWI/SNF complex through the BAF60c subunit. *J Biol Chem* 279:16677-16686.

Deshpande, G, Stuke, J und Schedl, P. 1995. *scute* (*sis-b*) function in *Drosophila* sex determination. *Mol Cell Biol* 15:4430-4440.

Dhalluin, C, Carlson, JE, Zeng, L, He, C, Aggarwal, AK und Zhou, MM. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399:491-496.

Dingwall, AK, Beek, SJ, McCallum, CM, Tamkun, JW, Kalpana, GV, Goff, SP und Scott, MP. 1995. The *Drosophila* *snr1* and *brm* proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. *Mol Biol Cell* 6:777-791.

Dorn, R, Szidonya, J, Korge, G, Sehnert, M, Taubert, H, Archoukieh, E, Tschiersch, B, Morawietz, H, Wustmann, G, Hoffmann, G und et al. 1993. P transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 133:279-290.

Duffy, JB und Gergen, JP. 1991. The *Drosophila* segmentation gene *runt* acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene *Sex-lethal*. *Genes Dev* 5:2176-2187.

Edgar, BA und Schubiger, G. 1986. Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. *Cell* 44:871-877.

Eisen, JA, Sweder, KS und Hanawalt, PC. 1995. Evolution of the SNF2 family of proteins: subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Res* 23:2715-2723.

Elfring, LK, Deuring, R, McCallum, CM, Peterson, CL und Tamkun, JW. 1994. Identification and characterization of Drosophila relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Mol Cell Biol* 14:2225-2234.

Elfring, LK, Daniel, C, Papoulas, O, Deuring, R, Sarte, M, Moseley, S, Beek, SJ, Waldrup, WR, Daubresse, G, DePace, A, Kennison, JA und Tamkun, JW. 1998. Genetic analysis of brahma: the Drosophila homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. *Genetics* 148:251-265.

Elgin, SC. 1988. The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation. *J Biol Chem* 263:19259-19262.

Engels, WR, Johnson-Schlitz, DM, Eggleston, WB und Sved, J. 1990. High-frequency P element loss in Drosophila is homolog dependent. *Cell* 62:515-525.

Erickson, JW und Cline, TW. 1993. A bZIP protein, sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in Drosophila development to determine sex. *Genes Dev* 7:1688-1702.

Everid, AC, Small, JV und Davies, HG. 1970. Electron-microscope observations on the structure of condensed chromatin: evidence for orderly arrays of unit threads on the surface of chicken erythrocyte nuclei. *J Cell Sci* 7:35-48.

Finch, JT und Klug, A. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1897-1901.

Fleming, W. 1882. Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. F.C.W. Vogel, Leipzig.

Franklin, SE und Gosling, RG. 1953. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171:740-741.

Frischer, LE, Hagen, FS und Garber, RL. 1986. An inversion that disrupts the Antennapedia gene causes abnormal structure and localization of RNAs. *Cell* 47:1017-1023.

Fry, CJ und Peterson, CL. 2002. Transcription. Unlocking the gates to gene expression. *Science* 295:1847-1848.

Fujita, SC, Zipursky, SL, Benzer, S, Ferrus, A und Shotwell, SL. 1982. Monoclonal antibodies against the Drosophila nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:7929-7933.

Gilbert, W und Muller-Hill, B. 1967. The lac operator is DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:2415-2421.

Greenspan, R.J. 1997. Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Hassan, AH, Neely, KE und Workman, J.L. 2001. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* 104:817-827.

Hassan, AH, Prochasson, P, Neely, KE, Galasinski, SC, Chandy, M, Carrozza, MJ und Workman, J.L. 2002. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111:369-379.

Henikoff, S und Henikoff, J.G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10915-10919.

Hertz, GZ und Stormo, G.D. 1999. Identifying DNA and protein patterns with statistically significant alignments of multiple sequences. *Bioinformatics* 15:563-577.

Hirschhorn, JN, Brown, SA, Clark, CD und Winston, F. 1992. Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* 6:2288-2298.

Horabin, JI und Schedl, P. 1993. Regulated splicing of the *Drosophila* sex-lethal male exon involves a blockage mechanism. *Mol Cell Biol* 13:1408-1414.

Hoshijima, K, Inoue, K, Higuchi, I, Sakamoto, H und Shimura, Y. 1991. Control of doublesex alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. *Science* 252:833-836.

Hoshijima, K, Kohyama, A, Watakabe, I, Inoue, K, Sakamoto, H und Shimura, Y. 1995. Transcriptional regulation of the Sex-lethal gene by helix-loop-helix proteins. *Nucleic Acids Res* 23:3441-3448.

Hsiao, PW, Fryer, CJ, Trotter, KW, Wang, W und Archer, TK. 2003. BAF60a mediates critical interactions between nuclear receptors and the BRG1 chromatin-remodeling complex for transactivation. *Mol Cell Biol* 23:6210-6220.

Hummel, T, Krukkert, K, Roos, J, Davis, G und Klambt, C. 2000. *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26:357-370.

Ito, T, Yamauchi, M, Nishina, M, Yamamichi, N, Mizutani, T, Ui, M, Murakami, M und Iba, H. 2001. Identification of SWI.SNF complex subunit BAF60a as a determinant of the transactivation potential of Fos/Jun dimers. *J Biol Chem* 276:2852-2857.

Jackson, DA, Dickinson, P und Cook, PR. 1990. The size of chromatin loops in HeLa cells. *Embo J* 9:567-571.

Jacob, F und Monod, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318-356.

Jacobson, RH, Ladurner, AG, King, DS und Tjian, R. 2000. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* 288:1422-1425.

James, TC und Elgin, SC. 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 6:3862-3872.

Jenuwein, T und Allis, CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.

Ji, X, Zhang, P, Armstrong, RN und Gilliland, GL. 1992. The three-dimensional structure of a glutathione S-transferase from the mu gene class. Structural analysis of the binary complex of isoenzyme 3-3 and glutathione at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 31:10169-10184.

Jorgensen, EM und Garber, RL. 1987. Function and misfunction of the two promoters of the *Drosophila* Antennapedia gene. *Genes Dev* 1:544-555.

Jun, S und Desplan, C. 1996. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development* 122:2639-2650.

Jursnich, VA und Burtis, KC. 1993. A positive role in differentiation for the male doublesex protein of *Drosophila*. *Dev Biol* 155:235-249.

Kadam, S, McAlpine, GS, Phelan, ML, Kingston, RE, Jones, KA und Emerson, BM. 2000. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev* 14:2441-2451.

Kal, AJ, Mahmoudi, T, Zak, NB und Verrijzer, CP. 2000. The *Drosophila* brahma complex is an essential coactivator for the trithorax group protein zeste. *Genes Dev* 14:1058-1071.

Kalderon, D, Roberts, BL, Richardson, WD und Smith, AE. 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509.

Kelley, RL, Solovyeva, I, Lyman, LM, Richman, R, Solovyev, V und Kuroda, MI. 1995. Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* 81:867-877.

Kelley, RL, Wang, J, Bell, L und Kuroda, MI. 1997. Sex lethal controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism. *Nature* 387:195-199.

Kennison, JA und Tamkun, JW. 1988. Dosage-dependent modifiers of polycomb and antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8136-8140.

Kiehart, DP und Feghali, R. 1986. Cytoplasmic myosin from *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 103:1517-1525.

Kim, J, Johnson, K, Chen, HJ, Carroll, S und Laughon, A. 1997. *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 388:304-308.

Kornberg, RD. 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871.

Koszewski, NJ, Henry, KW, Lubert, EJ, Gravatte, H und Noonan, DJ. 2003. Use of a modified yeast one-hybrid screen to identify BAF60a interactions with the Vitamin D receptor heterodimer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87:223-231.

Kramer, SG, Jinks, TM, Schedl, P und Gergen, JP. 1999. Direct activation of Sex-lethal transcription by the *Drosophila* runt protein. *Development* 126:191-200.

Krebs, JE, Kuo, MH, Allis, CD und Peterson, CL. 1999. Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene. *Genes Dev* 13:1412-1421.

Lachner, M, O'Carroll, D, Rea, S, Mechtler, K und Jenuwein, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410:116-120.

Laemmli, UK, Kas, E, Poljak, L und Adachi, Y. 1992. Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Curr Opin Genet Dev* 2:275-285.

Laski, FA, Rio, DC und Rubin, GM. 1986. Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44:7-19.

Latchman, D. 1995. Gene regulation: a eukaryotic perspective. Chapman & Hall, London.

Laurent, BC, Treich, I und Carlson, M. 1993. The yeast SNF2/SWI2 protein has DNA-stimulated ATPase activity required for transcriptional activation. *Genes Dev* 7:583-591.

Lilley, DM. 1992. DNA--protein interactions. HMG has DNA wrapped up. *Nature* 357:282-283.

Lindsley, DL und Zimm, GG. 1992. The Genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.

Locke, J, Kotarski, MA und Tartof, KD. 1988. Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in Drosophila and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 120:181-198.

Lorch, Y, Cairns, BR, Zhang, M und Kornberg, RD. 1998. Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* 94:29-34.

Lorch, Y, Zhang, M und Kornberg, RD. 2001. RSC unravels the nucleosome. *Mol Cell* 7:89-95.

Luger, K, Mader, AW, Richmond, RK, Sargent, DF und Richmond, TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260.

Mackenzie, SM, Brooker, MR, Gill, TR, Cox, GB, Howells, AJ und Ewart, GD. 1999. Mutations in the white gene of *Drosophila melanogaster* affecting ABC transporters that determine eye colouration. *Biochim Biophys Acta* 1419:173-185.

Mahmoudi, T und Verrijzer, CP. 2001. Chromatin silencing and activation by Polycomb and trithorax group proteins. *Oncogene* 20:3055-3066.

Marenda, DR, Zraly, CB, Feng, Y, Egan, S und Dingwall, AK. 2003. The Drosophila SNR1 (SNF5/INI1) subunit directs essential developmental functions of the Brahma chromatin remodeling complex. *Mol Cell Biol* 23:289-305.

Martens, JA und Winston, F. 2002. Evidence that Swi/Snf directly represses transcription in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 16:2231-2236.

Martens, JA und Winston, F. 2003. Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Curr Opin Genet Dev* 13:136-142.

Mayall, TP, Sheridan, PL, Montminy, MR und Jones, KA. 1997. Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR alpha enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro. *Genes Dev* 11:887-899.

Miescher, F. 1871. Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinish-Chemische Untersuchungen: Aus dem Laboratorium für Angewandte Chemie zu Tübingen / herausgegeben von Felix Hoppe-Seyler* 4:441-460.

Moore, GD, Sinclair, DA und Grigliatti, TA. 1983. Histone gene multiplicity and position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 105:327-344.

Mottus, R, Reeves, R und Grigliatti, TA. 1980. Butyrate suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 178:465-469.

Neely, KE, Hassan, AH, Brown, CE, Howe, L und Workman, JL. 2002. Transcription activator interactions with multiple SWI/SNF subunits. *Mol Cell Biol* 22:1615-1625.

Neigeborn, L und Carlson, M. 1984. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108:845-858.

Ng, HH, Robert, F, Young, RA und Struhl, K. 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome-remodeling complex. *Genes Dev* 16:806-819.

Nie, Z, Yan, Z, Chen, EH, Sechi, S, Ling, C, Zhou, S, Xue, Y, Yang, D, Murray, D, Kanakubo, E, Cleary, ML und Wang, W. 2003. Novel SWI/SNF chromatin-remodeling complexes contain a mixed-lineage leukemia chromosomal translocation partner. *Mol Cell Biol* 23:2942-2952.

Nielsen, AL, Sanchez, C, Ichinose, H, Cervino, M, Lerouge, T, Chambon, P und Losson, R. 2002. Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *Embo J* 21:5797-5806.

Niessing, D, Rivera-Pomar, R, La Rosee, A, Hader, T, Schock, F, Purnell, BA und Jackle, H. 1997. A cascade of transcriptional control leading to axis determination in *Drosophila*. *J Cell Physiol* 173:162-167.

Olins, AL und Olins, DE. 1974. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 183:330-332.

Oudet, P, Gross-Bellard, M und Chambon, P. 1975. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4:281-300.

Owen, DJ, Ornaghi, P, Yang, JC, Lowe, N, Evans, PR, Ballario, P, Neuhaus, D, Filetici, P und Travers, AA. 2000. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *Embo J* 19:6141-6149.

Owen-Hughes, T, Utley, RT, Cote, J, Peterson, CL und Workman, JL. 1996. Persistent site-specific remodeling of a nucleosome array by transient action of the SWI/SNF complex. *Science* 273:513-516.

Papoulas, O, Beek, SJ, Moseley, SL, McCallum, CM, Sarte, M, Shearn, A und Tamkun, JW. 1998. The Drosophila trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development* 125:3955-3966.

Papoulas, O, Daubresse, G, Armstrong, JA, Jin, J, Scott, MP und Tamkun, JW. 2001. The HMG-domain protein BAP111 is important for the function of the BRM chromatin-remodeling complex in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5728-5733.

Paroush, Z, Finley, RL, Jr., Kidd, T, Wainwright, SM, Ingham, PW, Brent, R und Ish-Horowicz, D. 1994. Groucho is required for Drosophila neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* 79:805-815.

Paulson, JR und Laemmli, UK. 1977. The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12:817-828.

Peter, A. 2001. Identifizierung und Charakterisierung essenzieller X-chromosomaler Gene von *Drosophila melanogaster*. Dissertation. Technische Universität zu Braunschweig.

Phelan, ML, Sif, S, Narlikar, GJ und Kingston, RE. 1999. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* 3:247-253.

Pina, B, Bruggemeier, U und Beato, M. 1990. Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. *Cell* 60:719-731.

Pirrotta, V. 1988. Vectors for P-mediated transformation in Drosophila. *Biotechnology* 10:437-456.

Ptashne, M. 1967. Specific binding of the lambda phage repressor to lambda DNA. *Nature* 214:232-234.

Pultz, MA und Baker, BS. 1995. The dual role of hermaphrodite in the *Drosophila* sex determination regulatory hierarchy. *Development* 121:99-111.

Quinn, J, Fyrberg, AM, Ganster, RW, Schmidt, MC und Peterson, CL. 1996. DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 379:844-847.

Rea, S, Eisenhaber, F, O'Carroll, D, Strahl, BD, Sun, ZW, Schmid, M, Opravil, S, Mechtler, K, Ponting, CP, Allis, CD und Jenuwein, T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593-599.

Reichhart, JM und Ferrandon, D. 1998. Technique notes: Green balancers. *Dros Inform Serv* 81:201-202.

Renz, M, Nehls, P und Hozier, J. 1977. Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:1879-1883.

Reuter, G und Wolff, I. 1981. Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 182:516-519.

Richmond, TJ, Finch, JT, Rushton, B, Rhodes, D und Klug, A. 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311:532-537.

Roberts, DB. 1986. *Drosophila: A practical approach*. IRL Press, Oxford.

Rubin, GM, Hong, L, Brokstein, P, Evans-Holm, M, Frise, E, Stapleton, M und Harvey, DA. 2000. A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science* 287:2222-2224.

Saha, A, Wittmeyer, J und Cairns, BR. 2002. Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev* 16:2120-2134.

Sambrook, J und Russell, DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sawa, H, Kouike, H und Okano, H. 2000. Components of the SWI/SNF complex are required for asymmetric cell division in *C. elegans*. *Mol Cell* 6:617-624.

Schiessel, H, Gelbart, WM und Bruinsma, R. 2001. DNA folding: structural and mechanical properties of the two-angle model for chromatin. *Biophys J* 80:1940-1956.

Schneuwly, S, Klemen, R und Gehring, WJ. 1987. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 325:816-818.

Schütt, C und Nöthiger, R. 2000. Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127:667-677.

Shanahan, F, Seghezzi, W, Parry, D, Mahony, D und Lees, E. 1999. Cyclin E associates with BAF155 and BRG1, components of the mammalian SWI-SNF complex, and alters the ability of BRG1 to induce growth arrest. *Mol Cell Biol* 19:1460-1469.

Sheridan, PL, Sheline, CT, Cannon, K, Voz, ML, Pazin, MJ, Kadonaga, JT und Jones, KA. 1995. Activation of the HIV-1 enhancer by the LEF-1 HMG protein on nucleosome-assembled DNA in vitro. *Genes Dev* 9:2090-2104.

Sif, S, Saurin, AJ, Imbalzano, AN und Kingston, RE. 2001. Purification and characterization of mSin3A-containing Brg1 and hBrm chromatin remodeling complexes. *Genes Dev* 15:603-618.

Simon, JA und Tamkun, JW. 2002. Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Curr Opin Genet Dev* 12:210-218.

Smith, CL, Horowitz-Scherer, R, Flanagan, JF, Woodcock, CL und Peterson, CL. 2003. Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol* 10:141-145.

Sosnowski, BA, Belote, JM und McKeown, M. 1989. Sex-specific alternative splicing of RNA from the transformer gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell* 58:449-459.

Soutoglou, E und Talianidis, I. 2002. Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation. *Science* 295:1901-1904.

Stern, M, Jensen, R und Herskowitz, I. 1984. Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *J Mol Biol* 178:853-868.

Strahl, BD und Allis, CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.

Talbert, PB und Garber, RL. 1994. The *Drosophila* homeotic mutation *Nasobemia* (*AntpNs*) and its revertants: an analysis of mutational reversion. *Genetics* 138:709-720.

Talbert, PB und Henikoff, S. 2000. A reexamination of spreading of position-effect variegation in the white-rough region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154:259-272.

Tamkun, JW, Deuring, R, Scott, MP, Kissinger, M, Pattatucci, AM, Kaufman, TC und Kennison, JA. 1992. *brahma*: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* 68:561-572.

Tartof, KD, Hobbs, C und Jones, M. 1984. A structural basis for variegating position effects. *Cell* 37:869-878.

Tautz, D und Pfeifle, C. 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98:81-85.

Tearle, RG, Belote, JM, McKeown, M, Baker, BS und Howells, AJ. 1989. Cloning and characterization of the *scarlet* gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 122:595-606.

Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F und Higgins, DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.

Tschiersch, B, Hofmann, A, Krauss, V, Dorn, R, Korge, G und Reuter, G. 1994. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* 13:3822-3831.

Tsubota, S und Schedl, P. 1986. Hybrid dysgenesis-induced revertants of insertions at the 5' end of the rudimentary gene in *Drosophila melanogaster*: transposon-induced control mutations. *Genetics* 114:165-182.

Tsukiyama, T. 2002. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:422-429.

van Holde, KE. 1989. *Chromatin*. Springer-Verlag, New York.

Vazquez, M, Moore, L und Kennison, JA. 1999. The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 126:733-742.

Vignali, M, Hassan, AH, Neely, KE und Workman, JL. 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol* 20:1899-1910.

Wakimoto, BT. 1998. Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 93:321-324.

Wallrath, LL und Elgin, SC. 1995. Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev* 9:1263-1277.

Wang, W, Chi, T, Xue, Y, Zhou, S, Kuo, A und Crabtree, GR. 1998. Architectural DNA binding by a high-mobility-group/kinesin-like subunit in mammalian SWI/SNF-related complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:492-498.

Watson, JD und Crick, FH. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.

Weiler, KS und Wakimoto, BT. 1995. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 29:577-605.

Weintraub, H und Groudine, M. 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193:848-856.

Wilkins, MH, Stokes, AR und Wilson, HR. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171:738-740.

Wilsker, D, Patsialou, A, Dallas, PB und Moran, E. 2002. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development. *Cell Growth Differ* 13:95-106.

Woodcock, CL und Dimitrov, S. 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11:130-135.

Xue, Y, Canman, JC, Lee, CS, Nie, Z, Yang, D, Moreno, GT, Young, MK, Salmon, ED und Wang, W. 2000. The human SWI/SNF-B chromatin-remodeling complex is related to yeast rsc and localizes at kinetochores of mitotic chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13015-13020.

Younger-Shepherd, S, Vaessin, H, Bier, E, Jan, LY und Jan, YN. 1992. deadpan, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell* 70:911-922.

Yu, J, Li, Y, Ishizuka, T, Guenther, MG und Lazar, MA. 2003. A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *Embo J* 22:3403-3410.

Zhang, L und Gralla, JD. 1990. In situ nucleoprotein structure involving origin-proximal SV40 DNA control elements. *Nucleic Acids Res* 18:1797-1803.

Zhang, HS, Gavin, M, Dahiya, A, Postigo, AA, Ma, D, Luo, RX, Harbour, JW und Dean, DC. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 101:79-89.

Zrally, CB, Marenda, DR, Nanchal, R, Cavalli, G, Muchardt, C und Dingwall, AK. 2003. SNR1 is an essential subunit in a subset of *Drosophila* brm complexes, targeting specific functions during development. *Dev Biol* 253:291-308.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Herbert Jäckle angefertigt.

Mein erster und ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle für die stete Unterstützung während des Verlaufs dieser Arbeit und für die großen Freiräume, die er mir in der Ausgestaltung des Projektes gelassen hat.

Herrn Prof. Dr. H.-H. Arnold danke ich für die Vertretung der Arbeit an der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität zu Braunschweig.

Gordon Dowe danke ich für DNA-Sequenzierungen, Ursula Jahns-Meyer und Iris Plischke für Fliegeninjektionen.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Ulrich Schäfer, Nicole Beinert und Meike Werner, ohne deren Arbeit an der Sättigung des X-Chromosoms mit P-Element-Insertionen diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie bedanke ich mich für die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie für das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich bei Ralf Pflanz, Alexander Prell und Alexey Matyash für ihre Hilfsbereitschaft bei verschiedenen Fragestellungen bedanken. Mathias Beller danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin Sonja Nolte für die Geduld, die sie in den letzten dreieinhalb Jahren aufgebracht hat, und für ihr fortwährendes Verständnis.